



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

POSIBLES MECANISMOS ANTIFIBROGENICOS DE LA MMP19

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Biol. PAUL DANIEL JARA PELÁEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO CEMO

FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTORAL: DR. MOISES SELMAN LAMA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

DRA. MARCIA HIRIART HURDANIVIA

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

MEXICO, D.F.

OCTUBRE 2015



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.

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar intersticial progresiva y generalmente letal de etiología desconocida que se caracteriza por una aberrante activación de las células epiteliales que inducen la migración, proliferación y la activación de los fibroblastos dando lugar a la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos responsables del depósito excesivo de componentes de la matriz extracelular (MEC) y la remodelación del tejido pulmonar. Observaciones previas en nuestro laboratorio mostraron que la expresión de la metaloproteasa de matriz 19 (MMP19) está aumentada en la FPI. Con objeto de investigar el papel que desempeña esta enzima en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, se instilaron ratones silvestres y deficientes de la MMP19 con bleomicina y se comparó la respuesta inflamatoria en los lavados bronquioalveolares y el desarrollo de fibrosis pulmonar. Los resultados mostraron que los ratones MMP19^{-/-} contienen un número significativamente menor de neutrófilos y una menor actividad de mieloperoxidasa. Sin embargo, la respuesta fibrosante analizada por hidroxiprolina fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los ratones MMP19^{-/-} y fueron notables los focos de miofibroblastos. En este contexto se decidió explorar el papel de la MMP19 en el comportamiento de los fibroblastos pulmonares. Con este propósito se aislaron fibroblastos de pulmón derivados de ratones silvestres y deficientes de MMP19. El análisis por microarreglos reveló la desregulación de varias vías profibrosantes incluyendo la formación de la matriz extracelular, la migración, la proliferación y la autofagia. Estudios funcionales confirmaron estos hallazgos. En comparación con los ratones control, los fibroblastos de pulmones MMP19^{-/-} mostraron un aumento del gen de la colágena alfa 1 (I) y en la producción de proteínas de colágena en condiciones basales y después del tratamiento con TGF-beta, y un aumento de la expresión de la alfa actina de músculo liso (alfa-SMA) ($p < 0,05$). Del mismo modo, fibroblastos de pulmón deficientes de MMP19 mostraron un aumento significativo en la tasa de crecimiento ($p < 0,01$), y en la transmigración a través de cámaras Boyden recubiertas con colágena tipo I o con Matrigel ($p < 0,05$). Estos hallazgos sugieren que en fibroblastos de pulmón, la MMP-19 tiene fuertes efectos reguladores sobre

la síntesis de los componentes clave de la MEC, en fibroblastos en la diferenciación a miofibroblastos y en su migración y en su proliferación. Estos resultados sugieren que la MMP19 tiene un efecto protector en el desarrollo de la fibrosis pulmonar.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and usually lethal lung interstitial disease of unknown etiology characterized by an aberrant activation of epithelial cells that induce migration, proliferation and activation of fibroblasts leading to fibroblasts/myofibroblasts foci formation responsible for the excessive deposition of extracellular matrix (ECM) components and abnormal lung tissue remodeling. Previous observations in our laboratory showed that the expression of matrix metalloproteinase 19 (MMP19) is increased in IPF. To investigate the role of this enzyme in the development of pulmonary fibrosis, wild-type and MMP19 deficient mice were instilled with bleomycin and the inflammatory response on bronchoalveolar washings and the development of pulmonary fibrosis was compared. The results showed that MMP19^{-/-} mice contain a significantly fewer number of neutrophils and less myeloperoxidase activity. However, fibrotic response analyzed by hydroxyproline content was significantly higher ($p < 0.05$) in MMP19^{-/-} mice and it were remarkable in myofibroblasts foci formation. In this context it was decided to explore the role of MMP19 in the behavior of lung fibroblasts. For this purpose lung fibroblasts derived from wild-type and MMP19 deficient mice were isolated. Microarray analysis revealed deregulation of several profibrotic pathways including extracellular matrix formation, migration, proliferation and autophagy. Functional studies confirmed these findings. Compared to control mice, lung MMP19^{-/-} fibroblasts showed an increased expression of collagen gene alpha1 (I) and in the collagen protein production in basal conditions and after treatment with TGF-beta, and an increased expression of alpha smooth muscle actin (alpha-SMA) ($p < 0.05$). In the same way, lung fibroblasts of MMP19^{-/-} mice showed a significant growth rate increase ($p < 0.01$), and in transmigration through Boyden chambers coated with type I collagen or Matrigel ($p < 0.05$). These findings suggest that in lung fibroblasts, MMP19 has a strong regulatory effect on the synthesis of key ECM components, in fibroblasts differentiation into myofibroblasts and in their migration and proliferation. These results suggest that MMP19 has a protective effect on the development of lung fibrosis.

Índice

Introducción

Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	7
Focos de fibroblastos.....	10
Metaloproteasas de matriz.....	14
Dominios estructurales de las MMPs.....	18
Metaloproteasa de matriz 19.....	25
Actividad bioquímica de la MMP19.....	30

Objetivos.....	34
----------------	----

Hipótesis.....	34
----------------	----

Material y métodos

Determinación genotípica de ratones por PCR.....	35
Modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.....	36
Determinación de hidroxiprolina.....	37
Obtención de Lavado Bronquio-Alveolar (LBA).....	37
Ensayo de actividad de Mieloperoxidasa (MPO).....	38
Ensayo de citosinas en LBA.....	38
Western-Blot de Tenascina-C.....	39
Obtención de cultivos primarios.....	40
Análisis de tasa de crecimiento de Fibroblastos.....	41
Apoptosis de fibroblastos de pulmón.....	42
Ensayo de trans migración de fibroblastos.....	42
Cuantificación de la síntesis de colágena.....	43
Western-blot α SMA.....	43
Microarreglos de fibroblastos.....	44
PCR-Tiempo real.....	45
Inmunohistoquímica.....	45

Resultados

Determinación de genotipo de ratón.....	47
Determinación colorimétrica de Hidroxiprolina.....	48
Tenascina-C en Pulmón de ratón.....	50
Estudio de células inflamatorias en LBA de ratones instilados con Bleomicina.....	51
Ensayo de actividad de Mieloperoxidasa en ratones instilados a 7 días.....	52
Análisis de citosinas en lavado bronquio-alveolar de ratones instilados.....	53

Expresión de la MMP19 en fibroblastos de pulmón de ratón.....	54
Análisis de Microarreglos.....	55
Expresión y síntesis de colágena.....	59
Expresión de alfa actina de musculo liso α SMA.....	59
Ensayo de Tasa de crecimiento de Fibroblastos de pulmón de ratón.....	60
Ensayo de Apoptosis.....	61
Ensayo de trans migración en matriz.....	63
Discusión.....	64
Conclusión.....	72
Bibliografía.....	74
Anexo.....	74

INTRODUCCIÓN

Fibrosis Pulmonar Idiopática

Los desórdenes fibroproliferativos se encuentran entre las causas principales de morbilidad y mortalidad en el mundo. El reemplazo del tejido normal y funcional por excesivo tejido fibroso puede ocurrir en los principales tejidos y órganos resultando en varios desórdenes incluyendo: cerebrales, cardiacos, desordenes vasculares periféricos, cirrosis hepática, así como desordenes intersticiales de pulmón (1). Algunos desórdenes fibróticos tienen una etiología infecciosa (bacterias, virus, hongos), que provocan una respuesta inflamatoria que en algunos casos puede ser crónica (2).

La fibrosis pulmonar difusa es el resultado de un conjunto heterogéneo de padecimientos respiratorios agrupados bajo el término de Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID), que en términos generales se caracterizan por un desequilibrio entre síntesis y degradación de la Matriz Extracelular (MEC) que resulta en la distorsión de la arquitectura pulmonar. La clasificación patológica de las EPID incluye dos grupos generales: neumonía infiltrativa difusa con una presentación histológica específica de causa conocida y enfermedades de causa desconocida o idiopáticas (3,4).

Dentro de las EPID de causa conocida se encuentran aquellas provocadas por la inhalación de partículas inorgánicas tales como sílice, asbesto y partículas metálicas, así como aquellas provocadas por la inhalación de partículas orgánicas como antígeno aviario (5). También el uso de ciertos medicamentos como la bleomicina usada como antineoplásico produce fibrosis pulmonar en forma dosis dependiente. La instilación intratraqueal de bleomicina es utilizada en investigación básica como el principal agente fibrogénico en modelos animales. En el ratón es el principal modelo utilizado debido a que la presentación y distribución de las lesiones puede asemejarse a ciertas neumonías intersticiales (6-8).

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva y letal. Es la más frecuente de las EPID de causa desconocida. Las curvas de supervivencia para FPI son peores que para muchos casos de cáncer, con una supervivencia media de 2-4 años después del diagnóstico (9-11). La FPI se presenta más en los hombres que en las mujeres y con mayor incidencia al aumentar la edad, dos de cada tres casos se presentan en personas mayores de 60 años, así como fumar es un factor de riesgo de padecer FPI (9,12-14).

Tradicionalmente la FPI se trataba como una enfermedad resultado de un proceso inflamatorio no resuelto. Sin embargo existe evidencia de que la FPI podría no ser el resultado de inflamación crónica. Estudios en ratones deficientes de genes ligados al proceso inflamatorio y a factores fibrosantes, demuestran que es posible una respuesta fibrótica en ausencia del proceso inflamatorio (15,16). Adicionalmente la falta de respuesta en pacientes de FPI al tratamiento con anti-inflamatorios esteroideos con o sin inmunosupresores, eficaces en el tratamiento de enfermedades que tienen como fondo un proceso inflamatorio conocido. En el mismo sentido, la falta de evidencia histológica de inflamación preponderante en fases tempranas de la FPI, condujeron a la hipótesis de que la FPI se caracteriza por una secuencia de eventos diferentes al resto de las EPID de causa inflamatoria (17). Esta propuesta sugiere que la FPI es el resultado de una alteración en la comunicación y/o función epitelio-fibroblasto. La FPI inicia con microlesiones en el epitelio alveolar y su activación es seguida por la migración y proliferación de fibroblastos que se diferencian en miofibroblastos. Los miofibroblastos pueden provocar el rompimiento de la membrana basal, depósito de MEC y apoptosis en las células epiteliales alveolares, perpetuando el daño e impidiendo la regeneración del epitelio (17,18). Figura A.

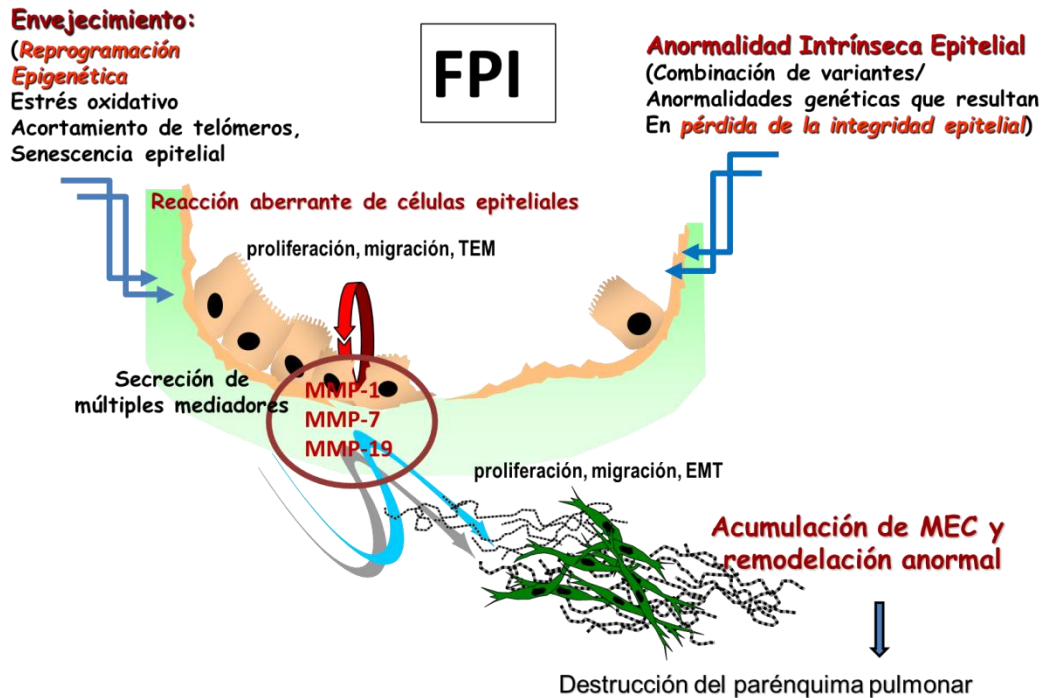


Figura A. Esquema hipotético del modelo de reparación anormal de daño en la FPI. Fuente: Selman M, Pardo A. **Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis an integral model.** *Am J Resp Crit Care Med*, 189: 1161-72. 2014.

El resultado de la FPI son septos alveolares engrosados localizados predominantemente en la región subpleural. La histopatología característica asociada a FPI conocida como neumonía intersticial usual, UIP (por sus siglas en inglés Usual Interstitial Pneumonia), tiene una apariencia heterogénea. Incluye áreas de parénquima pulmonar normal, así como sitios localizados de fibrosis con la presencia de estructuras conocidas como focos de fibroblastos/miofibroblastos (FF) responsables del depósito exagerado de proteínas de MEC (12). Los pacientes con esta patología reportan función pulmonar restringida o deteriorada y tos seca por un periodo mayor a 6 meses que se va agravando con el paso del tiempo (14).

Focos de fibroblastos

La presencia de los focos de fibroblastos/miofibroblastos en la UIP que caracteriza la FPI se compone de cúmulos de células del mesénquima en sitios donde hubo daño epitelial y su abundancia y extensión se relaciona con un peor pronóstico y pobre supervivencia (19-21). Los focos de fibroblastos son zonas de giros laxos de MEC de pálida tinción comúnmente adyacentes a zonas de pulmón normal. Consisten de pequeñas colecciones intersticiales en forma de domo inter espaciados con numerosas células tipo fibroblasto/miofibroblasto (12,22).

Los FF son considerados como sitios de fibrogénesis activa que dirigen la remodelación irreversible de la arquitectura pulmonar. Ha sido el blanco de muchos grupos de investigación el tratar de elucidar los mecanismos que se encuentran activos y que permiten la formación de los FF, su actividad fibrogénica, y la persistencia de estos en la FPI.

A diferencia de la FPI, los modelos animales experimentales como la instilación con bleomicina sí producen inflamación y lesiones que son reversibles. El estudio de modelos animales ha señalado el papel patogénico de ciertas citocinas y quimiocinas proinflamatorias y profibrosantes cuyo papel ha sido corroborado en estudios de pacientes con IPF (23). Entre las citocinas y quimiocinas más ampliamente reportadas con un papel activo en los FF están: IL-1, TNF- α , PDGF, TGF- β y miembros de la familia de quimiocinas CXC como IL-8 entre otras.

IL-1 es una citocina con propiedades proinflamatorias y en modelos animales se ha reportado su papel en la patogénesis de enfermedades fibrosantes y en el pulmón se encuentra principalmente en macrófagos alveolares de pacientes con FPI (24,25). Estimula el fenotipo fibrótico a través de la inducción de PDGF, proliferación de fibroblastos y síntesis de procolágena I y III (26,27). La inhibición de IL-1 en un modelo animal de fibrosis disminuye el grado de las lesiones (28).

TNF- α es producida por macrófagos y linfocitos activados, células epiteliales y endoteliales. En pacientes con FPI, TNF- α se encuentra expresado en el pulmón en sitios de fibrosis pulmonar (23). Esta citocina inflamatoria tiene un papel central en la estimulación de la adhesión célula-célula y migración transendotelial así como en la cascada de producción de citocinas y quimiocinas (29). También activa la proliferación de fibroblastos y su capacidad para degradar MEC. Sin embargo, modelos animales han reportado efectos contrarios en cuanto al papel de TNF- α en la fibrosis. Se ha reportado tanto su actividad profibrotica y proinflamatoria como su efecto protector en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (30,31).

El PDGF ha sido ubicado en la patogénesis de la FPI en la cascada de conocidas moléculas proinflamatorias y profibrosantes como IL-1, TNF- α y TGF- β (32-34). El PDGF es producido por varios tipos celulares en el pulmón como macrófagos alveolares, fibroblastos y células epiteliales y endoteliales (23). Se ha reportado su incremento en FPI y modelos animales de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (35). El PDGF tiene un reconocido efecto quimiotáctico de células del mesénquima y podría favorecer la formación de los focos de fibroblastos. También puede estimular la producción de MEC, principalmente colágena tipo I (36).

TGF- β es una de las citocinas más reconocidas con un efecto profibrótico en el pulmón. La expresión de TGF- β 1 así como la secreción de la proteína se encuentra aumentada tanto en la FPI como en el modelo animal de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (37,38). El TGF- β modula la fibrosis pulmonar a través del reclutamiento y activación de monocitos y fibroblastos, induce la síntesis de MEC e induce la angiogénesis. La proliferación de fibroblastos también podría ser un efecto indirecto del TGF- β por la inducción de FGF-2 y la consecuente activación de la vía de MAP cinasa (39) figura B. Quizá el efecto profibrosante más importante del TGF- β es a través de la inducción de la diferenciación de los

fibroblastos a miofibroblastos, los cuales representan la principal fuente de MEC en la fibrosis (40).

Los miofibroblastos en los FF son comúnmente identificados por la expresión de α -actina de musculo liso (α -SMA por sus siglas en inglés Smooth muscle actin). La aparición de *novo* de los miofibroblastos en los FF está asociado con el periodo de fibrosis activa y en proceso de reparación de daño se considera que interviene en la contracción de la herida. Sin embargo, durante procesos patológicos de reparación tisular la actividad de los miofibroblastos persiste y su función contráctil y secretora de MEC lleva a la deformación del tejido. El mecanismo de diferenciación de fibroblastos se inicia con la unión del TGF- β al receptor tipo II que permite la fosforilación y reclutamiento del receptor tipo I formando el complejo receptor heterodimérico. La actividad cinasa serina/treonina del complejo activado fosforila Smad 2 y 3. Cada una se une a Smad4 y se translocan al núcleo facilitando la transcripción. La expresión de α SMA en fibroblastos de pulmón es principalmente mediante la unión de Smad3 al elemento de unión a Smad-1 en la secuencia promotora del gen de SMA (40,41). La señalización del TGF- β promueve también la transcripción de genes de MEC incluyendo colágena I, III, IV y V, fibronectina y proteoglicanos (42). Por otro lado suprime la actividad de algunas (MMP1, MMP8) Metaloproteasas de Matriz (MMPs), activador de plasminógeno y elastasa con resultados en la inhibición de la degradación de colágenas (43,44).

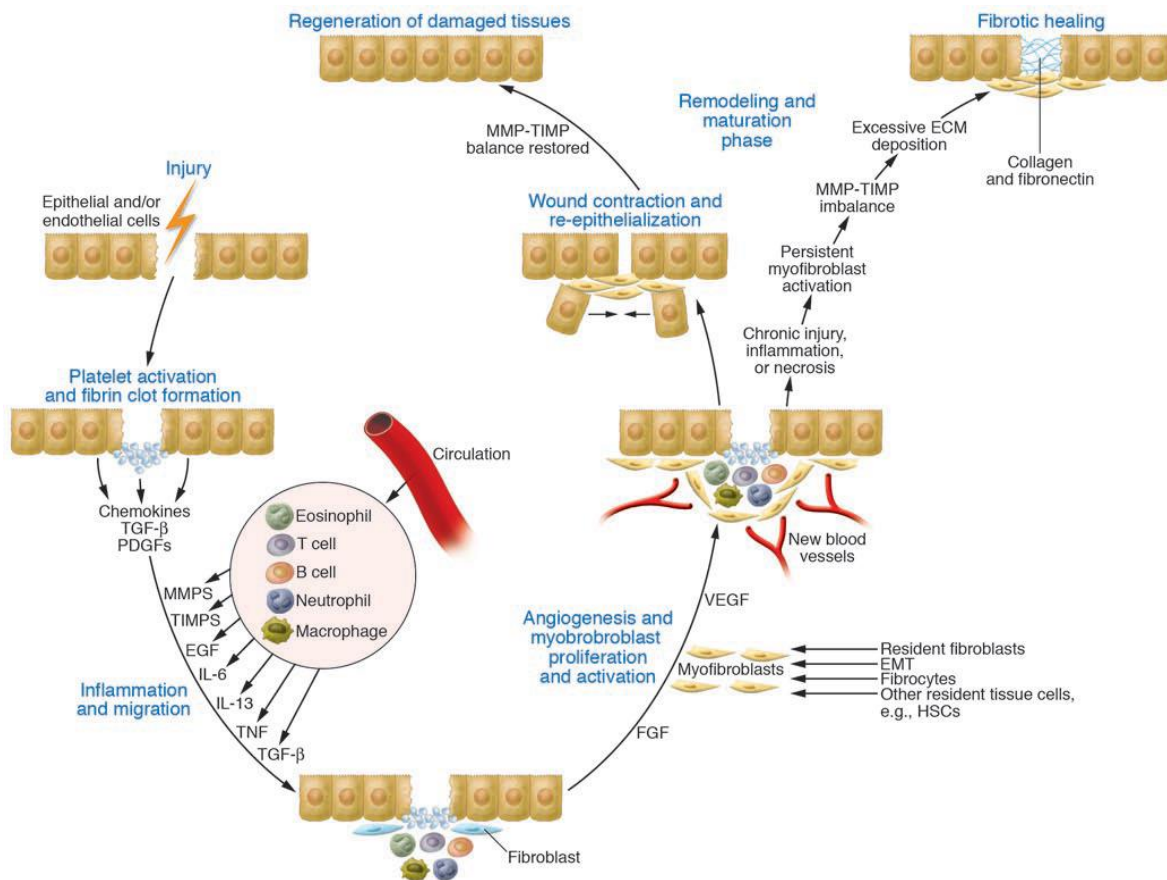


Figura B. Resultados de la resolución de heridas: regeneración del tejido ó fibrosis. Se representa la participación células, MMPs, citosinas y factores de crecimiento en respuesta al daño inicial por la vía inflamatoria y su resolución o desarrollo de fibrosis. Fuente: Wynn T, **Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases.** *J. Clin. Invest.* 117:524–529. 2007

Varios miembros de la familia de las MMPs también están sobre expresadas en la FPI. Las MMPs tienen un papel activo en procesos como morfogénesis, reparación tisular y en la progresión de enfermedades como la artritis, cáncer, úlceras tisulares crónicas, enfisema y fibrosis pulmonar debido a que tienen actividad proteolítica sobre virtualmente todos los componentes macromoleculares de la MEC. Pero también tienen actividad sobre mediadores bioactivos de gran importancia como citocinas y quimiocinas, factores angiogénicos, y factores de crecimiento que se encuentran en el espacio extracelular (45-47). Estudios en

nuestro grupo de trabajo han mostrado que la MMP1, MMP2, MMP7 y MMP9, están altamente expresadas en FPI y desempeñan un papel importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, aún cuando los mecanismos exactos no están del todo caracterizados (43,48-50) figura B.

En la remodelación fisiológica después de un daño, la actividad contráctil de los miofibroblastos cesa cuando el tejido esta reparado, disminuye la expresión de SMA y los miofibroblastos desaparecen por apoptosis. La eliminación de miofibroblastos por apoptosis es esencial durante la reparación normal de heridas, un proceso que puede estar alterado la FPI. Fibroblastos/miofibroblastos aislados de pulmones de pacientes con enfermedades pulmonares fibróticas muestran significativa variabilidad en propiedades proliferativas y apoptóticas cuando son cultivados *ex vivo* (51-53). Estudios *in vitro* han mostrado mayor susceptibilidad de los miofibroblastos de entrar en apoptosis en comparación con fibroblastos normales (54), pero en presencia de TGF- β muestran resistencia a la apoptosis (55). En vista de las múltiples funciones del TGF- β promoviendo la diferenciación de los miofibroblastos y su permanencia, la falta de TGF- β en la zona de FF podría representar una señal de apoptosis para los miofibroblastos, lo cual tiene respaldo experimental, *in vitro*, TGF- β confiere resistencia a los fibroblastos a la apoptosis inducida por privación de suero en cultivo (56). *In vivo*, en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, la disminución en la expresión de TGF- β correlaciona con una disminución en el número de miofibroblastos (57,58).

Metaloproteasas de Matriz

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son un grupo de 23 endopeptidasas que desempeñan un papel central en la remodelación de tejido conjuntivo que ocurre en una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas (59). En un periodo mayor de 50 años desde que se descubrió su primer miembro en 1961 hasta la actualidad, las MMPs han mostrado tener participación directa o a través

de sus sustratos en procesos comunes a muchos tejidos como la reparación y remodelación tisular en respuesta al daño hasta su resolución. De igual manera, se ha demostrado su participación en la progresión de condiciones patológicas tales como la artritis, cáncer, úlceras tisulares crónicas, enfisema y fibrosis pulmonar, entre otras enfermedades. La razón de esta participación es debido a que su actividad proteolítica se difunde sobre virtualmente todos los componentes macromoleculares de la MEC, así como sobre mediadores bioactivos de gran importancia que se encuentran almacenados en la matriz extracelular como lo son: citocinas y quimiocinas, factores angiogénicos, y factores de crecimiento (60,61).

La mayoría de las MMPs son secretadas al espacio extracelular y algunas de ellas se expresan con dominios transmembranales en la superficie de la membrana celular (MT-MMPs). Sin embargo estudios recientes muestran que ciertas MMPs, tales como MMP-1, MMP-2 y MMP-11, pueden encontrarse dentro de la célula y pueden actuar como proteínas intracelulares (62-64). La expresión y actividad de las MMPs es muy baja en tejidos normales. La actividad de las MMPs en el medio extracelular es regulada por los Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas (TIMP's por sus siglas en ingles) y por proteínas inhibitoras no específicas como α_2 -macroglobulina (65). La expresión de las MMPs es transcripcionalmente controlada por citocinas inflamatorias (interleucinas e interferon, TNF- α), factores de crecimiento (TGF- β , EGF, KGF y varios factores de crecimiento de fibroblastos, PDGF), hormonas, interacciones célula-célula y célula-MEC (47, 66).

La familia de las MMPs comparte un conjunto de dominios relacionados estructural y funcionalmente. En base a la presencia de estos dominios y a la afinidad por sustratos, es que las MMPs se dividen en subgrupos relacionados: MMPs arquetípicas, matrilisinas, gelatinasas y MMPs activables por convertasa (45, 67) figura C, tabla 1.

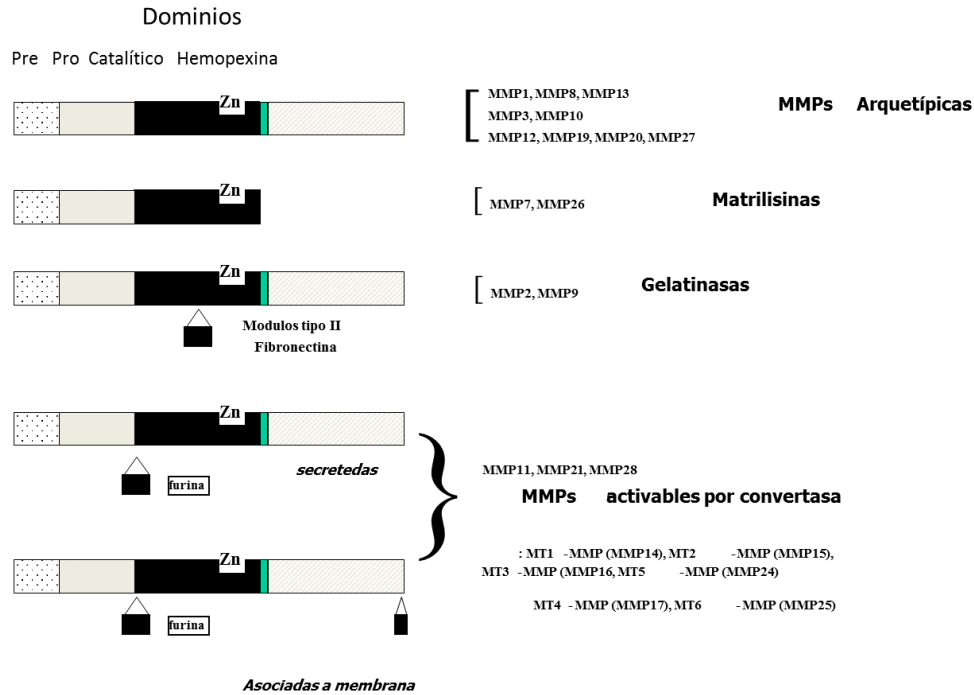


Figura C. Clasificación de las Metaloproteasas de Matriz (MMPs) de acuerdo a sus dominios estructurales. Fuente: Pardo A, Selman M, **Matrix Metalloproteasas in Aberrant Fibrotic Tissue Remodeling**. *Proc Am Thorac Soc Vol 3. pp 383–388, 2006.*

Las MMPs arquetípicas, es el grupo donde se encuentran la mayoría de las MMPs (MMP1, MMP3, MMP8, MMP10, MMP12, MMP13, MMP19, MMP20, MMP27). Estructuralmente están compuestas de un pro-dominio N-terminal seguido de un dominio catalítico de unión a zinc, una región espaciadora tipo bisagra y finalmente un dominio tipo hemopexina (67) figura C.

Las gelatinasas (MMP2 y MMP9), se componen por los mismos dominios estructurales de las MMPs arquetípicas pero contienen 3 dominios tipo fibronectina II intercalados en el dominio catalítico que les confiere afinidad por

sustratos de la membrana basal, principalmente colágena tipo IV y laminina. MMP2 además procesa colágena tipo I, II y III. (67,68) figura C, tabla 1.

Las Matrilisinas (MMP7 y MMP26), a diferencia de las MMPs arquetípicas carecen del dominio tipo hemopexina, por lo que son las más pequeñas dentro de las MMPs. Además de componentes de la matriz extracelular, la MMP7 procesa moléculas de superficie celular tales como pro- α -defensina, Fas-ligando, TNF- α , E-caderina (67,69) tabla1.

Las MMPs activables por convertasa incluye a las MMPs asociadas a membrana (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24, MMP25), así como MMPs que no se anclan a membrana MMP11, MMP21 y MMP28. Estas MMPs tienen una hendidura adicional tipo furina entre el pro-dominio y el dominio catalítico que permite la activación intracelular de los zimógenos por proteasas tipo serina (67, 70).

Enzymes	ECM substrates	Non-ECM substrates
Secreted-type MMP		
Collagenases		
Interstitial collagenase (MMP-1)	Collagens I, II, III, VII and X; gelatins; aggrecan; link protein; entactin; tenascin; perlecan	α 2-M; α 1-Pi; α 1-antichymotrypsin; IGFBP-2, 3, 5; proL-1 β ; CTGF
Neutrophil collagenase (MMP-8)	Collagens I, II and III; gelatins; aggrecan; link protein	α 1-Pi
Collagenase-3 (MMP-13)	Collagens I, II, III, IV, IX, X and XIV; aggrecan; Fn; tenascin; osteonectin; Ln; Perlecan	CTGF; ProTGF- β ; MCP-3; α 1-antichymotrypsin
Gelatinases		
Gelatinase A (MMP-2)	Gelatins; collagens IV, V, VII, X and XI; Ln; Fn; elastin; aggrecan; link protein	ProTGF- β ; FGF receptor I; MCP-3; IGFBP-5; proL-1 β ; galectin-3; plasminogen
Gelatinase B (MMP-9)	Gelatins; collagens III, IV and V; aggrecan; elastin; entactin; link protein, vitronectin; N-telopeptide of collagen I	ProTGF- β ; IL-2 receptor α ; Kit-L; IGFBP-3; proL-1 β ; ICAM-1; α 1-Pi; galectin-3; plasminogen
Stromelysins		
Stromelysin-1 (MMP-3)	Aggrecan; decorin; gelatins; Fn; Ln; collagens III, IV, IX and X; tenascin; link protein; perlecan	IGFBP-3; proL-1 β ; HB-EGF; CTGF; E-cadherin; α 1-antichymotrypsin; α 1-Pi; α 2-M; plasminogen; uPA; proMMP-1, 7, 8, 9, 13
Stromelysin-2 (MMP-10)	Aggrecan; Fn; Ln; collagens III, IV and V; link protein	Pro1, 8, 10
Matrilysins		
Matrilysin-1 (MMP-7)	Aggrecan; gelatins; Fn; Ln; elastin; entactin; collagen IV; tenascin; decorin; link protein	Pro α -defensin; Fas-L; β 4 integrin; E-cadherin; proTNF α ; CTGF; HB-EGF; RANKL; IGFBP-3; plasminogen
Matrilysin-2 (MMP-26)	Gelatin; collagen IV; Fn; fibrinogen; vitronectin	ProMMP-9; α 1-Pi
Furin-activated MMP		
Stromelysin-3 (MMP-11)	Fn; Ln; aggrecan; gelatins	α 1-Pi; α 2-M; IGFBP-1
Eplysin (MMP-28)	Unknown	Casein
Other secreted-type MMP		
Matrilysin-3 (MMP-12)	Elastin; aggrecan; Fn; collagen IV; osteonectin; Ln; nidogen	Plasminogen; apolipoprotein(a)
RASI-1 (MMP-19)	Collagen IV; gelatin; Fn; tenascin; aggrecan; COMP; Ln; nidogen	IGFBP-3
Enamelysin (MMP-20)	Amelogenin; aggrecan; gelatin; COMP	Unknown
MMP-21	Unknown	Unknown
MMP-27	Unknown	Unknown
Membrane-anchored MMP		
Type I transmembrane-type MMP		
MT1-MMP (MMP-14)	Collagens I, II and III; gelatins; aggrecan; Fn; Ln; fibrin; Ln-5	ProMMP-2; proMMP-13; CD44; MCP-3; tissue transglutaminase
MT2-MMP (MMP-15)	Fn; tenascin; nidogen; aggrecan; perlecan; Ln	ProMMP-2; tissue transglutaminase
MT3-MMP (MMP-16)	Collagen III; Fn; gelatin	ProMMP-2; tissue transglutaminase
MT5-MMP (MMP-24)	PG	ProMMP-2
GPI-linked MMP		
MT4-MMP (MMP-17)	Gelatin; fibrinogen	Unknown
MT6-MMP (MMP-25)	Gelatin; collagen IV; fibrin; Fn; Ln	ProMMP-2
Type II transmembrane-type MMP		
MMP-23	Gelatin	Unknown

Tabla 1. Sustratos de las MMPs humanas. Fuente: Shiomi T, Lemaitre V, D'Armiento J, Okada Y. **Matrix metalloproteinases, a desintegrin and metalloproteinases, and a desintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases**, *Phat Inter* 60:477-496, 2010.

Dominios estructurales de las MMPs

Múltiples análisis de secuencia de los diferentes dominios estructurales de las MMPs modernas muestran que tuvieron una evolución temprana anterior a la divergencia entre vertebrados e invertebrados a partir de una enzima con una estructura más simple. Evidencia de esto es que existen homólogos de MMPs no solo entre animales sino también en plantas, algas y bacterias con dominios estructurales razonablemente conservados (71).

Todas las MMPs tienen un péptido señal N-terminal o predomino de aproximadamente 20 aminoácidos el cual es removido después de que este dirige su síntesis al retículo endoplásmico (45).

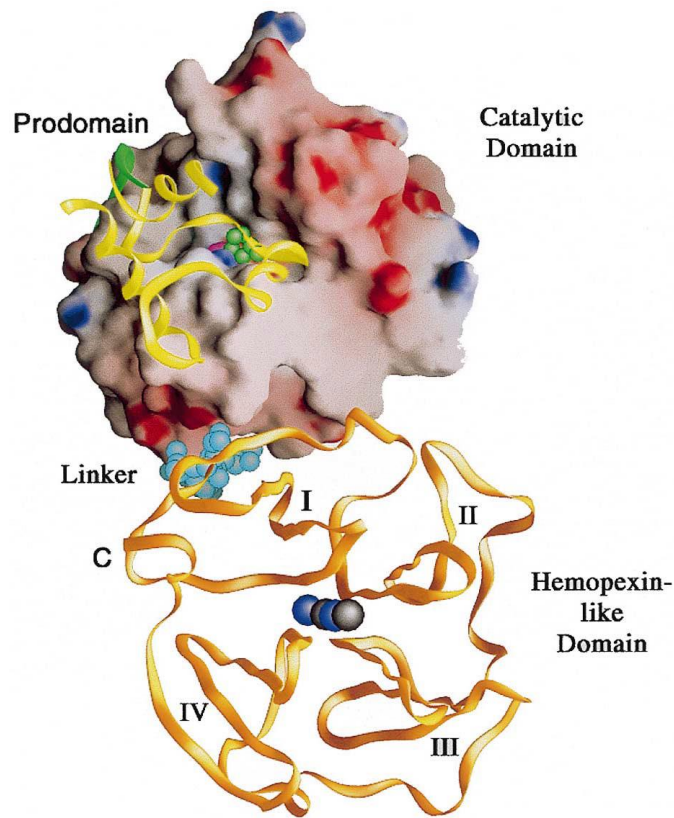


Figura D. Modelo estructural de los dominios estructurales de la proMMP arquetípica. Fuente: Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. **Structural properties of matrix metalloproteinases**, CMLS 55:639-652, 1998

El pro-dominio de las MMPs o dominio de latencia tienen un tamaño de alrededor de 80 aminoácidos. Contiene un motivo PRCGXPD característico conservado en todas las MMPs con excepción de la MMP23. Este motivo le permite unirse a la secuencia consenso HEXGHXXGXXH de unión a zinc en el dominio catalítico manteniendo el estado de latencia. Tridimensionalmente la unión de estos motivos conservados se da debido a que el pro-peptido tiene forma similar a un huevo que ataca con su parte redondeada el sitio activo del dominio catalítico, un arreglo concordante opuesto al arreglo del sitio activo y sus alrededores (45, 69, 70) figura D. Aparte de las pocas MMPs que son activadas por furina, la mayoría son secretadas como zimógenos en la matriz extracelular.

La activación de las MMPs por interrupción de la interacción del pro-dominio y su eliminación puede ser realizada *in vivo* por proteinasas tisulares o plasmáticas así como por otras MMPs (45, 72, 73). *In vitro* pueden ser activadas por agentes químicos tales como SDS, compuestos orgánicos de mercurio o especies reactivas de oxígeno (74) figura E.

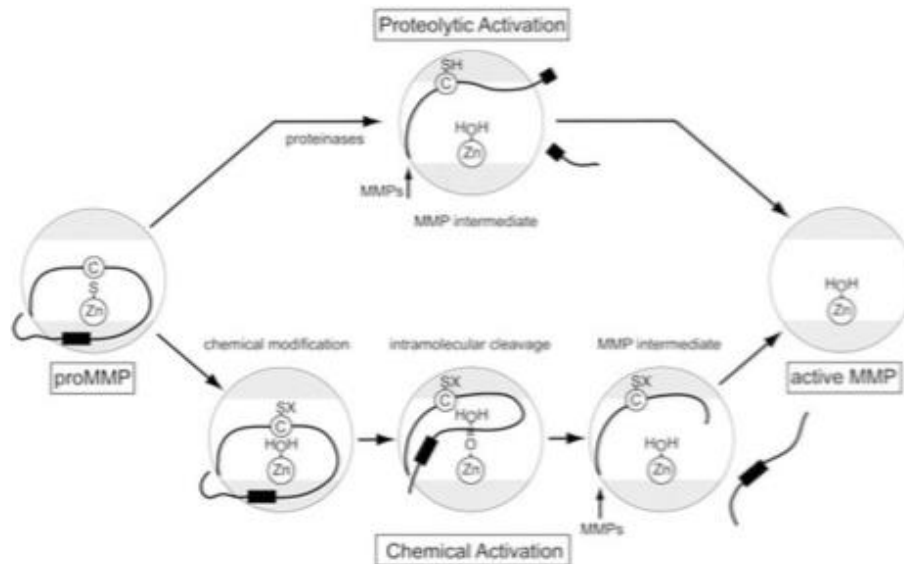


Figura E. Activación de las proMMPs. Las proMMPs son liberadas como zimogenos inactivos los cuales pueden ser activados por proteinasas (parte superior) o por agentes no proteolíticos (parte inferior). El dominio catalítico se representa como un círculo gris con el sitio activo conteniendo el Zinc catalítico en blanco. El prodominio se representa esquemáticamente como una línea en color negro. La activación completa se da cuando se remueve proteolíticamente el propeptido. La activación química se basa en la modificación del sulfidrilo (SX) del interruptor de cisteína © resultando en una activación parcial de la hendidura del sitio activo de la MMP y el propeptido. La activación completa se da por la remoción del propeptido por procesamiento intermolecular. Fuente: Visse R, Nagase H. **Matrix and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry**, *Circ Res* 92:827.839. 2003

Estructuralmente el dominio catalítico de las MMPs con aproximadamente 170 aminoácidos tiene forma de elipsoide oblicuo (70) figura F. El sitio activo se asemeja a una fisura pequeña en la parte plana y superficial del elipsoide que se extiende horizontalmente a través del dominio catalítico para unirse al sustrato de izquierda a derecha, figura F. La profundidad de la hendidura varía entre las

MMPs y se piensa está relacionado con la preferencia por sustratos (68,69). Esta pequeña hendidura abriga el zinc catalítico y marca el fin del sub-dominio pequeño (68). El sub-dominio mayor está formado por tres cuartas partes de la cadena polipeptídica y consiste de 5 láminas β -plegadas flanqueadas por tres horquillas superficiales en su lado convexo y por dos grandes α -hélices en su lado cóncavo rodeando un núcleo hidrofóbico (75). El sub-dominio menor contiene una doble hebra que está unido estructuralmente al zinc, la cual es de primaria importancia para la unión al sustrato peptídico y a los inhibidores (68).

El dominio catalítico en lo general de todas las MMPs es muy similar, siendo el de las collagenasas los más parecidos, mientras que el de las MMP7 y MTMMP-1 son los más diferentes (68). El sitio catalítico de la proteinasas contiene un zinc catalítico, un zinc estructural, y generalmente, tres iones de calcio (69) figura F.

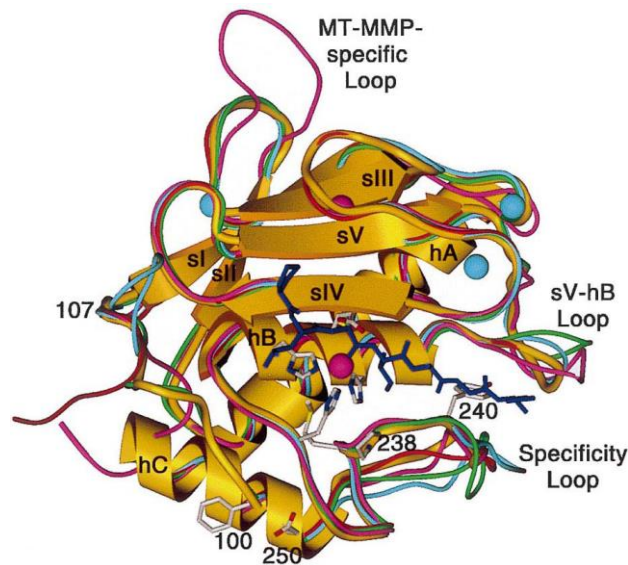


Figura F. **Estructura de listón del dominio catalítico de la MMP.** El dominio catalítico de la MMP8 es su forma Phe100 se muestra junto con el modelado sustrato heptapéptido (azul oscuro), se superpone con el dominio catalítico de la MMP3 (azul), MMP1 (rojo), MMP14 (rosa) y MMP7 (verde). El zinc catalítico y el estructural (centro y parte superior) y los tres iones de calcio (flanqueando) se muestran como esferas rosa y azul, respectivamente, y los tres residuos de His ligando el zinc catalítico, la Glu catalítica en el medio. El segmento de cadena formando el dominio extra de ambas gelatinasas se insertará en el bucle SV- Hb (centro, derecha) que presumiblemente, se extiende al lado derecho. Figura hecha con Setor. Fuente: Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. **Structural properties of matrix metalloproteinases**, *CMLS* 55:639-652, 1998

Las tres histidinas de la secuencia consenso (HEXGHXXGXXH) que rodean al zinc catalítico junto con una molécula de agua son los cuatro ligandos del zinc catalítico necesarios para su actividad proteolítica (71) figura F. Adicionalmente, el ácido glutámico adyacente a la primera histidina es esencial para la catálisis. (69) La hidrólisis peptídica es asistida por el grupo carboxilo del ácido glutámico, el cual sirve como una base general para el paso del protón desde la molécula de agua desplazada, de esta manera facilita el ataque nucleofílico de la molécula de agua sobre el grupo carbonilo de la unión peptídica de la proteína blanco (68). Inmediatamente a la derecha del zinc catalítico el bolsillo de especificidad S1' se invagina y en forma y tamaño difiere considerablemente entre las MMPs (69). La variación en el tamaño del bolsillo S1' se debe principalmente a la orientación que le proporciona la parte inicial de la hélice del sitio activo y la interacción atómica del residuo de aminoácido presente. La interacción de S1' es la principal determinante de la afinidad del inhibidor tisular (TIMP) y de la posición del rompimiento del sustrato peptídico. En adición el sitio S1'tambein participa en la especificidad por el sustrato de la enzima (68-70).

Segundo en importancia para la especificidad por el sustrato dentro del dominio catalítico parece ser por la interacción entre el residuo P3 con el mayormente hidrofóbico bolsillo S3 (en colagenasas el residuo P3 es siempre prolina). La actividad proteolítica de las MMPs depende de la interacción del ácido glutámico catalítico y su interacción con moléculas de agua y el zinc catalítico (68).

A continuación del dominio catalítico se encuentra la región bisagra variable según sea el caso de 12 a 17 residuos de aminoácidos. Esta región es rica en prolina y que le confiere una propiedad de flexibilidad considerable (74) figura D.

Finalmente, al extremo C-Terminal se encuentra el dominio tipo hemopexina de 195 residuos de aminoácido, figura D. Exhibe una forma de un disco elipsoidal oblicuo con estructuras realmente muy similares entre sí. Se denomina tipo hemopexina por su homología con la proteína de unión y transporte en plasma

que tiene ese nombre, tabla 2 (67.8% de similitud del dominio tipo hemopexina de la MMP19). Se organiza esencialmente por 4 láminas- β las cuales están arregladas casi simétricamente alrededor de un eje central en orden consecutivo dando lugar a la formación tridimensional de una propela de 4 aspas (68-70) figura D. El centro del eje se forma un túnel y en la entrada del mismo aloja un ion de calcio, el cual es tetragonalmente rodeado por el primer grupo carbonilo de cada una de las hebras. El centro del túnel se alberga además un ion de cloro formando una pareja calcio-cloro, figura D. La función de estos iones aún no está clara. Se ha demostrado en algunos casos específicos, como en el caso de las colagenasas, que el dominio tipo hemopexina se ha relacionado con el reconocimiento de sustratos, su especificidad, y regulación de su actividad como en la MMP9 donde el dominio tipo hemopexina actúa como un antagonista de la actividad enzimática bloqueando su unión con el sustrato y por consecuencia su procesamiento. (76). En el caso, de las colagenasas la ausencia del dominio tipo hemopexina disminuye su eficacia para el rompimiento de la triple hélice de la colágena nativa. Adicionalmente al reconocimiento de sustrato, el dominio tipo hemopexina puede también mediar la unión de la MMP a la superficie celular por ejemplo en la integrina $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ que se unen a las gelatinasas A y B respectivamente (74,76).

	Accession number	Aligned residues	HPX_Adom		HPX_Cdom	
			Consensus (%)	Identity (%)	Consensus (%)	Identity (%)
HPX_Adom	NP_000604	45-233	100	100	33.0	22.6
HPX_Cdom	NP_000604	252-462	33.0	22.6	100	100
vtnc_rpt1	AAH05046	151-407	26.3	18.9	23.4	14.9
vtnc_rpt2	AAH05046	425-475	11.6	7.9	7.6	3.3
prg4_HPX	NP_005798	1141-1404	27.3	18.7	26.4	14.9
MMP-2_HPX	NP_004521	464-660	33.5	20.9	31.3	21.0
MMP-9_HPX	CAC07541	511-707	30.9	19.6	30.8	18.2
MMP-1_HPX	NP_002412	273-469	33.2	20.3	29.7	17.0
MMP-8_HPX	NP_002415	274-467	34.3	21.7	34.1	18.2
MMP-13_HPX	NP_002418	279-471	32.8	20.4	33.6	22.3
MMP-3_HPX	NP_002413	285-477	35.0	24.6	31.8	19.4
MMP-10_HPX	NP_002416	284-476	38.4	26.1	32.2	19.0
MMP-11_HPX	NP_005931	289-483	35.5	25.1	27.4	18.1
MMP-19_HPX	Q99542	284-475	35.9	24.1	31.9	17.8
MMP-14_HPX	NP_004986	314-511	32.3	20.4	29.9	18.2
MMP-15_HPX	P51511	365-562	33.2	23.4	29.1	18.3
MMP-16_HPX	P51512	338-534	33.0	22.7	26.3	16.9
MMP-17_HPX	Q9ULZ9	330-529	35.4	23.9	27.5	17.9
MMP-24_HPX	Q9Y5R2	375-572	33.3	21.6	27.2	18.8
MMP-25_HPX	NP_073209	312-511	29.2	20.1	26.4	17.9
MMP-12_HPX	NP_002417	277-470	36.8	26.5	29.9	18.0
MMP-20_HPX	NP_004762	291-483	34.0	21.2	30.8	19.4
MMP-21_HPX	NP_671724	335-563	25.4	18.3	23.6	14.5
MMP-27_HPX	NP_071405	274-468	35.8	21.9	28.8	16.0
MMP-28_HPX	NP_077278	319-513	26.9	18.3	29.0	20.6

Tabla 2. Homología comparada la Hemopexina y diversos dominios tipo Hemopexina. Los dominios tipo hemopexina fueron alineados mediante el programa AlingX en el vector NTI usando los parámetros de configuración basal del programa. La columna consenso (%) muestra el porcentaje total de posiciones con residuos de aminoácidos similares. La columna de Identidad (%) muestra el porcentaje total de residuos idénticos alineados. HPX_Adom (Dominio amino terminal de hemopexina). **HPX_Cdom (Dominio carboxilo** terminal de Hemopexina). Fuente: Piccard H, Van den Steen PE, Opdenakker G. Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins, *J Leukoc Biol.* 81(4):870-92.2007

Estudios en nuestro grupo de trabajo y otros han demostrado que algunas metaloproteasas tales como: MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9 y MMP13, están ampliamente expresadas en FPI, interviniendo en diversos eventos de la respuesta fibrótica. Así por ejemplo el ratón deficiente en MMP7 está protegido de la fibrosis inducida por bleomicina, la sobreexpresión de la a MMP1 en células pulmonares alveolares induce la migración de fibroblastos, sin embargo los mecanismos exactos no están bien caracterizados (2, 77-80).

Metaloproteasa de Matriz 19

La MMP19 humana fue inicialmente clonada de hígado y glándula mamaria y posteriormente también como un auto-antígeno en la membrana sinovial inflamada de un paciente que sufría de artritis reumatoide (81). La MMP19, también llamada RASI-1 (rheumatoid arthritis synovial inflammation), muestra características estructurales y de distribución en tejidos particulares dentro de las MMPs. Se ha detectado su expresión en una amplia variedad de tipos celulares como: células de músculo liso y de la túnica media; células de vasos sanguíneos sinoviales de pacientes con Artritis reumatoide; células capilares del endotelio aunque no en pacientes con inflamación crónica sinovial.

La expresión de MMP19 en vasos sanguíneos sugiere que esta podría estar involucrada en procesos como neo vascularización y angiogénesis (81-83). Posteriormente en estudios por Northern-blot se mostró que también se expresaba en condiciones basales en tejidos tales como: pulmón, bazo, intestino, páncreas, ovario y placenta (82,84) figura G, lo cual es rasgo distintivo dentro de las MMPs, ya que por lo regular los miembros de la familia de las MMPs no se producen frecuentemente en forma constitutiva en las células adultas en condiciones normales. Hallazgos publicados apuntan a que esta enzima juega un papel en el desarrollo del proceso inflamatorio y génesis tumoral de la piel, pues se detectó en fibroblastos de la dermis, y queratinocitos de piel humana, así como en células inflamatorias como monocitos nucleares y macrófagos. (84, 85)

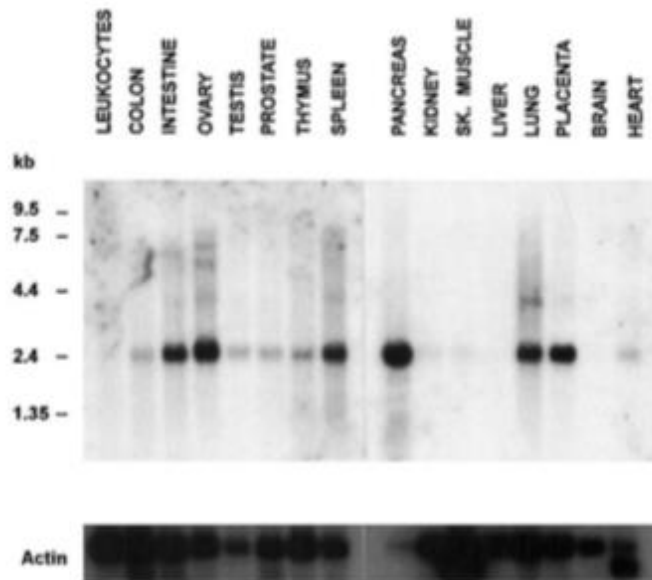


Figura G. Analisis de northern-blot de la MMP19 en diferentes tejidos humanos. Fuente: Pendas A, Knäuper V, Puente X, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, Lopez-Otin C. **Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution**, *Jour Bio Chem Vol. 272, No. 7 pp. 4281–4286*, 1997.

La MMP19 presenta el arreglo de dominios arquetípicos de las MMPs, sin embargo esta contiene una cola adicional de 36 residuos de aminoácidos en su extremo C-terminal que no tienen homología con ninguna otra MMP, figura H. Tiene un peso molecular de 57.4 kDa (Pro péptido y 43-45 kDa activa o procesada) (86), para un polipéptido de 508 residuos de aminoácidos (82). El gen murino es 79% idéntico al humano y tiene un peso aproximado de 59.1 kDa (87).

El gen de la hMMP19 se encuentra localizado en el cromosoma 12 brazo largo región q14, lo cual también es una localización peculiar, junto con la MT4-MMP se encuentra en el 12q24 (75, 82). El gen de la MMP19 se expande alrededor de 7.6 Kb y se compone de 9 exones que varían en longitud de 86pb a 1953pb. El exón 9

consiste de 1953 nucleótidos en su variante más larga y varía dependiendo de la región no codificante 3' que se considere. Incluye una secuencia codificante de 336pb. Los ocho intrones restantes se encuentran en el rango de 160pb a alrededor de 1.2 Kb (88). Con la excepción de la más pequeña de las MMPs, la matrilisina, la cual se compone de seis exones y el gen de la estromelisin-3 que se compone de ocho exones, la mayoría de las MMPs se organizan en 10 exones. Adicionalmente, las gelatinasas contienen tres exones más que codifican el dominio tipo fibronectina III, que se encuentran en los exones del 5-7. La MMP19 carece de otros componentes estructurales distintivos de otras subfamilias de las MMPs.

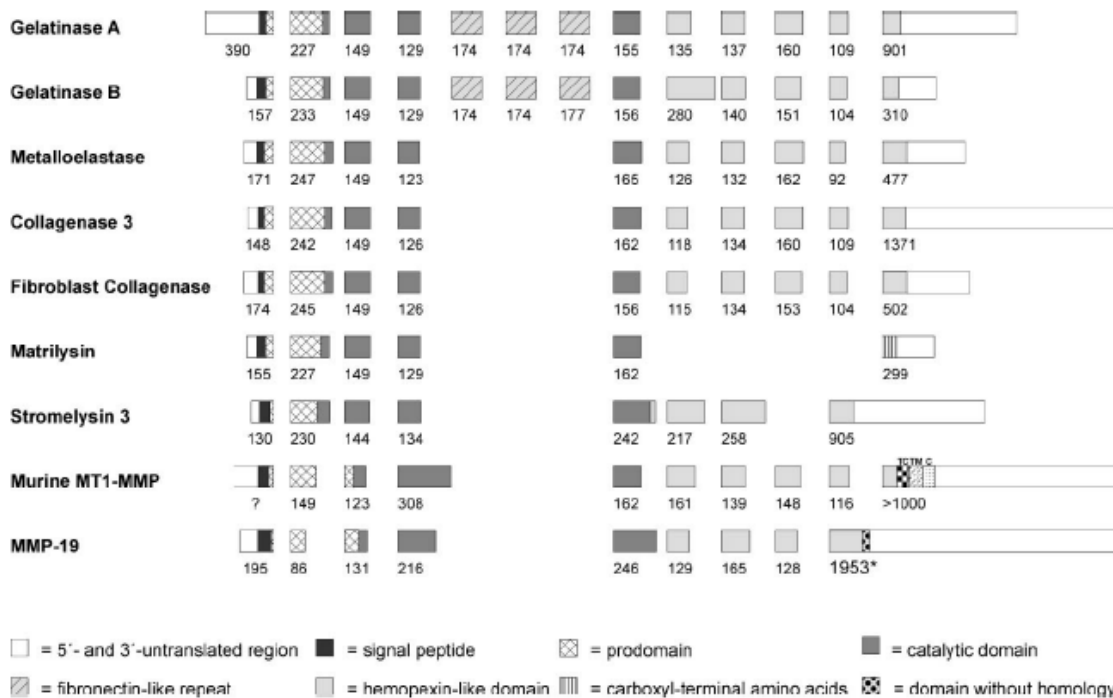


Figura H. Comparación de la estructura de intrones y exones del gen humano de la MMP19. Cada exón se representa a escala como un bloque cuya longitud se indica debajo de cada una. Un bloque abierto es representativo de que no se encuentra representado a escala. Fuente: Mueller M, Mauch S, Sedlacek R. **Structure of the human MMP-19 gene**, *Gene* 252(1-2) 27-37, 2000

La región promotora de MMP19 contiene elementos regulatorios típicos presentes en regiones promotoras de la familia de MMPs: una caja TATA en la posición -29, un potencial sitio de unión al factor de transcripción AP-1 en la posición -73 donde los homodímeros o heterodímeros de la proteína de Fos, Jun se pueden unir (88); un sitio potencial de unión tipo PEA3 no exacto al consenso en la posición -156 el cual puede ser reconocido por los productos de los protooncogenes Est1 y Est2; Finalmente, también presenta sitios potenciales de unión para otros factores de transcripción como NFκ-B, AP-2 y SP-1 (88).

El primer exón de la MMP19 codifica el péptido señal completo (18 aminoácidos) y la primer parte del pro dominio. El segundo exón codifica para otros 29 residuos de aminoácidos del propéptido, y los últimos 32 residuos de este dominio pertenecen al tercer exón en el cual los primeros 12 residuos del dominio catalítico se encuentran codificados. El exón cuatro codifica 72 residuos y el exón cinco codifica 82 residuos más del dominio catalítico el cual termina precisamente con este exón.

En comparación a otras MMPs, el dominio catalítico de la MMP19 se encuentra codificado en un menor número de exones. A excepción de la MMP14, el dominio catalítico de esta familia de enzimas se encuentra codificado desde el intrón 2 y hasta el 5. La región de unión al zinc catalítico se encuentra codificada en el exón 5 (88). El exón 6 codifica los 33 residuos de aminoácidos correspondientes a la región bisagra, pero también contiene los primeros 10 residuos del dominio tipo hemopexina. El resto del dominio tipo hemopexina se encuentra codificado en los exones 7 al 9. Finalmente el exón 9 codifica para 76 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal del dominio tipo hemopexina, así como para los 36 residuos de aminoácidos de la cola C-Terminal que no tiene homología con otras MMPs (88). Con excepción de la estromelicina-3, Las otras

MMPs codifican el dominio tipo hemopexina codificado en sus últimos 5 exones. En contraste, solo 4 exones del gen de la MMP19 contienen este dominio.

A pesar de que existe una similitud estructural en todos los dominios tipo hemopexina, poseen propiedades diferentes que son MMP específica, mientras que en otros casos su función permanece incierta

El dominio C-terminal de la MMP19 que no tiene homología en todas las MMPs, se compone de una extensión más allá de la Cys⁴⁷² de 36 residuos ricos en treonina la cual se extiende por 20 residuos más en su ortólogo murino (87-88). Contiene aminoácidos sin carga y no básicos, que le confiere una propiedad característica parcialmente hidrofóbica de acuerdo a la escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle (87). Una diferencia entre el ortólogo humano y murino es el número de glicosilaciones potenciales tipo N mientras que la hMMP19 tiene uno, su ortólogo murino contiene dos sitios potenciales de glicosilación tipo N (87). A pesar de que la cola C-terminal de la MMP19 no es un dominio transmembranal identificable, tiene secuencias con características similares que se sabe son una señal para la adición de anclas fosfatidil-inositol, lo cual permitiría interactuar con la superficie celular de diversos tipos celulares. Se reportó la expresión en la superficie celular de células monocíticas de sangre periférica activadas (PBMC por sus siglas en Inglés), así como en fibroblastos de pulmón y células mieloides THP-1 y HL-60 y en células derivadas de PBMC CD14⁺ (89). Por medio de inmunohistoquímica, la proteína se localizó en los vasos sanguíneos del sinovio y otros tejidos normales asociados con células de músculo liso (83). Por la capacidad de la MMP19 de degradar sustratos de la MEC y membrana basal su actividad podría ser importante para la fisiología de células PBMCs especialmente para la trans migración de estas a través de vasos sanguíneos (89).

Actividad Bioquímica de la MMP19

La proenzima de la MMP19 es propensa a autoactivarse debido posiblemente al hecho de que el interruptor de cisteína presenta una variación con respecto al consenso de otras MMPs, PRCGxPD por PRCGLED en la MMP19. Estudios de mutación (83) han mostrado que la modificación de este residuo en el prodominio en la MMP3 genera formas auto activables de la enzima. Ensayos bioquímicos de la actividad enzimática muestran gran capacidad de la MMP19 para degradar varios componentes de la MEC. La MMP19 hidroliza agregan, así como cartílago oligomérico, la cual es una abundante proteína localizada en cartílago y, tendones. El dominio catalítico de la MMP19 es capaz de cortar también la isoforma grande de la tenacina C, fibronectina, laminina heterotrimérica y nidógeno I. La colágena Tipo IV, el mayor componente de la membrana basal, es también eficientemente degradada por la MMP19, aunque la colágena tipo I no es degradada por la actividad enzimática de la MMP19. Se han identificado tres residuos de aminoácidos en las MMPs relacionadas con la actividad del dominio catalítico que degrada colágena I, Tyr-214; Asp-235; y Gly-337 (numeración de la colagenasa-3). En estas posiciones, la MMP19 tiene Val-204; Tyr-225; y Gln-227 que se localizan cerca del sitio de unión a zinc (figura I), haciendo improbable que la MMP19 degrade colágena I (82). Adicionalmente, la MMP19 procesa la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 3 (IGFBp-3) en la epidermis humana. (77, 90-91).

(MMP-1) ²⁰⁹EYNLHRVAAHELGHSLGLSHSTDIGA²³⁴
(MMP-8) ²⁰⁸NYNLFLVAAHEFGHSLGLAHSSDPGA²³³
(MMP-13) ²¹³GYNLFLVAAFEFGHSLGLDHSKDPGA²³⁸

(MMP-19) ²⁰³GVNLRITAAHEVGHALGLGHSRYSQA²²⁸

(MMP-3) ²⁰⁹GTNLFLVAAHEIGHSLGLFHSANTEA²³⁴
(MMP-10) ²⁰⁸GTNLFLVAAHELGHSLGLFHSANTEA²³³

Figura I. Comparación parcial de la secuencia de aminoácidos de la MMP19 humana con las colagenasas y la estromelisin. La secuencia de los genes fue tomada de la base de datos SwissProt y la alineación de secuencias se realizó con el programa PILEUP. Las secuencias de aminoácidos subrayadas muestran residuos de aminoácidos distintivos y diferentes entre colagenasas y estromelisin y la MMP19. Fuente: Pendas A, Knäuper V, Puente X, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, Lopez-Otin C. **Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution**, *Jour Bio Chem Vol. 272, No. 7 pp. 4281–4286*, 1997.

Análisis de la especificidad por sustrato reveló que el dominio catalítico de la MMP19 es capaz de hidrolizar el sustrato general de las MMPs Mca-Pro-Leu-Gly-Dpa-Ala-Arg-NH₂, y con mayor eficiencia, el sustrato de la estromelisin Mca-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (90) tabla 3.

Substrate	k_{cat}/K_m
	$M^{-1}s^{-1}$
1. Mca-Pro-Leu-Gly-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	1.93×10^3
2. Mca-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	3.09×10^4
3. Mca-Pro-Glu-Gly-Leu-Arg-Dpa-NH ₂	Not cleaved
4. Mca-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH ₂	Not cleaved
5. Mca-Thr-Glu-Gly-Glu-Ala-Arg-Gly-Ser-Dpa-NH ₂	Not cleaved
6. Mca-Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Lys(Dpn)-NH ₂	Not cleaved
7. Mca-His-Tyr-Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ser-His-Gly-Arg-Lys(Dpn)-D-Arg-OH	Not cleaved

Tabla 3. Especificidad de sustratos de la MMP19. 1, sustrato general de las MMPs; 2, sustrato de las estromelisin; 3, sustrato basado en la α 2-macroglobulina; 4, sustrato de las colagenasas; 5, sustrato basado en el sitio de corte de la agreganasa; 6, sustrato TNF- α convertasa, 7, sustrato basado en la proteína mielina básica generada por la desintegrina (MADAM). Fuente: Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendás AM, Smith B, López-Otin C, Murphy G, Knäuper V. **Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19: Evidence for a role as potent basement membrane degradation enzyme**. *J Biol Chem.*; 275:14809-14816. 2000

El análisis de la cinética de la interacción del sitio catalítico con los TIMPs resulta en una fuerte inhibición de la actividad de la enzima con TIMP-2, 3 y 4, mientras que la eficiencia de TIMP-1 es mucho menor (73). También se reportó que compuestos sintéticos basados en ácido hidroxiamico inhiben la actividad de la enzima (90).

El TNF- α aumenta la expresión de MMP19 en fibroblastos humanos en cultivo. Esta inducción en su expresión es parcialmente disminuida bloqueando la activación extracelular de ERK-1/2 por PD98059 y la actividad de p38 por SB203580. Así mismo, la inducción constitutiva de MAPK/ERK-1 resulta en la inducción de la expresión de MMP19. Sin embargo, la mayor inducción en su activación se dio cuando ERK1/2 fue activada constitutivamente junto con p38 (84).

Diversos estudios han sugerido que esta enzima tiene un papel en la angiogénesis debido a que muestra una prominente y constitutiva expresión en la capa basal de la epidermis, macrófagos, células del músculo liso y una expresión diferencial en células endoteliales y células epiteliales de glándula mamaria (84, 89, 92). Además, de acuerdo a sus características estructurales únicas y a su distribución tisular, puede ser que la MMP19 sea el primer miembro de una nueva subfamilia dentro de las MMPs con un nuevo papel en condiciones fisiológicas y *patológicas* (remodelación de tejidos asociados con adipogénesis y progresión de tumores).

Recientemente, usando microdissección laser y análisis de microarreglos, nuestro grupo de trabajo identificó la sobreexpresión de MMP-19 en el epitelio alveolar hiperplásico de pulmones de pacientes con FPI, así como en lavados

bronquio alveolares (LBA) de pacientes con la misma patología. Resultados preliminares en 2 ratones MMP19^{-/-} durante una estancia en el laboratorio del Dr López-Otín mostraron que, sorprendentemente, estos ratones carentes de esta metaloproteinasa desarrollaron una fibrosis pulmonar exacerbada en respuesta al tratamiento con bleomicina. Perturbaciones de los niveles de MMP-19 en células epiteliales in vivo e in vitro fueron asociados a cambios en la prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (PTGS2), sugiriendo que el rol protector de MMP-19 puede ser en parte a través de la inducción de esta enzima en las células del epitelio alveolar (93).

Una observación importante en los pulmones fibróticos del ratón deficiente de MMP-19, fue la extensa formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos, aunque, los mecanismos que subyacen no se exploraron. Es importante destacar que el foco representa áreas de una fibrogénesis activa que tiene un papel crítico en la progresión fibrótico que caracteriza a la FPI. (9,26).

En este contexto los objetivos de esta tesis fueron:

- 1. Analizar el papel de la MMP19 en un modelo de fibrosis pulmonar experimental inducido por bleomicina en ratones silvestres y en ratones deficientes de MMP19.**
- 2. Analizar el comportamiento funcional de MMP19 en distintos procesos clave del desarrollo de la FP en fibroblastos de pulmón derivados de ratones silvestres y de ratones deficientes para determinar su papel en el desarrollo de la patología.**

HIPÓTESIS

La MMP19 confiere un efecto protector al desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina regulando en fibroblastos la expresión de moléculas profibrosantes.

MATERIAL Y METODOS

Determinación genotípica de ratones por PCR

Los ratones C57BL/6/129O1 deficientes de Mmp19 (-/-) fueron amablemente donados por Carlos López Otín y se generaron como se describió anteriormente (92). La colonia de ratones se reprodujo y se mantuvo en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y el comité de Bioética del INER aprobó el protocolo de trabajo con los ratones.

Para determinar la carga genética del ratón se utilizaron fragmentos de 1.5 cm de las colas del ratones de 4 semanas de edad. Cada fragmento fue rasurado y tratado con buffer de lisis y proteinasa K a 55°C por toda la noche. Posteriormente el producto se centrifugó a 1000 rpm y 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y se le adicionó 1mL de etanol absoluto para ser centrifugado nuevamente. El sobrenadante se descartó por decantación y al botón obtenido se le adicionó etanol al 70% y se centrifugó una vez más a 1000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante se descartó por decantación y el botón se secó completamente a temperatura ambiente para finalmente ser resuspendido en 100µL de agua. La concentración de DNA se determinó en cada muestra en un espectrofotómetro UV NanoDrop ND-1000 a una longitud de onda de 260 nm. La pureza se determinó con la relación 260/280.

Se determinó la carga genética de los ratones por la amplificación de los productos de PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: Mmp19 sentido (5'-3') TCAAACACGCAAAGTTGGA; anti-sentido (5'-3') ATGTGTGTTTGGCCTGAGTG resultando en un producto de 211 pb del gen sin alteraciones de la MMP19

(Mmp19+/+). El cassette de neomicina utilizado para interrumpir la región promotora y los exones 1 y 2 del gen de la MMP19 en los ratones Mmp19^{-/-} se amplificó usando los siguientes oligonucleótidos: Sentido (5'-3') TCGGCCATTGAACAAGATGG; anti-Sentido (5'-3') GAGCAAGGTGAGATGACAGG resultando en un producto de 327 pb.

Modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

Ratones de 8 semanas de edad MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} se anestesiaron con una dosis de Avertin® intraperitoneal (Tribromoetanol 2.5gm 2, 2,2; 5 mL 2-methyl-2-butanol disuelto en 200 ml de agua destilada). Cuando la anestesia hizo efecto se realizó un corte en la piel del el cuello del ratón para exponer la tráquea y se instiló una dosis de bleomicina de acuerdo al peso del ratón en la proporción de 5U/kg o solución salina a través de una jeringa estéril de insulina de 1 mL. Se usó una grapa quirúrgica estéril para cerrar el corte en la piel del cuello y se roció la zona con Topazone® para evitar infecciones y favorecer la cicatrización. Los ratones se sacrificaron a los 7 y 21 días post-instilación para analizar la etapa inflamatoria y la fibrosante del modelo.

Los ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico calculada a partir del peso del ratón. Los pulmones fueron quirúrgicamente removidos de la cavidad torácica y lavados dos veces con solución salina precalentada a 37°C en agua a través de la arteria pulmonar. Los lóbulos derechos del pulmón fueron llenados cuidadosamente con una presión constante de formaldehído al 10% para su posterior análisis histológico. Los lóbulos izquierdos fueron conservados en nitrógeno líquido hasta su uso.

Determinación de hidroxiprolina

Los lóbulos pulmonares retirados del nitrógeno líquido se pesaron inmediatamente y se secaron por calor a 110°C hasta que alcanzaron un peso constante. Posteriormente los pulmones fueron hidrolizados por 24 hrs en HCl 6N a 110°C. Los pulmones hidrolizados fueron entonces procesados de acuerdo a la técnica colorimétrica de Woessner (94). Brevemente se prepara una curva estándar con 1-10µg de hidroxiprolina y se emplean 50µL de cada muestra de pulmón de ratón. La reacción que nos permite determinar el contenido de hidroxiprolina presente en cada muestra inicia con la oxidación del iminoácido por la adición de 1mL por muestra de cloramina T. Después de 20 minutos la cloramina T es eliminada por la adición de 1mL de ácido perclórico 2.5N. Finalmente 1mL de p-dimetilaminobenzaldehído 20% se agrega y se incuba en baño a 60°C por 20 minutos. La absorbancia de la reacción es determinada en el espectrofotómetro a 560 nm. Los contenidos de hidroxiprolina en pulmón se muestran como µg de hidroxiprolina por pulmón izquierdo.

Obtención de Lavado Bronquio-Alveolar (LBA)

Ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} instilados con bleomicina (5U/Kg) o solución salina fueron sacrificados a los 7 días con una dosis letal de pentobarbital sódico intraperitoneal de acuerdo al peso del ratón. La tráquea del ratón se expuso y se insertó una cánula y se hicieron lavados dos veces con 600 µL de solución salina estéril precalentada a 37°C en agua. Los LBA fueron centrifugados a 14000 rpm a 4°C y los sobrenadantes fueron recuperados por separado y mantenidos a -80°C

hasta el momento de su uso. Para conteo diferencial de células inflamatorias las células del botón se resuspendieron en 200µL de solución salina y carbowax 1:1. El número celular total fue obtenido mediante conteo celular manual con un hemocitómetro estándar. Las células inflamatorias en LBA se tiñeron con Wright-Giemsa y se cuantificaron por un patólogo experto (Dr. Miguel Gaxiola, INER, Mexico).

Ensayo de actividad de Mieloperoxidasa (MPO)

La actividad de la MPO fue determinada en LBA de ratones instilados con bleomicina o solución salina de ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} a partir de una curva estándar de actividad de MPO con enzima purificada (Sigma-Aldrich). La reacción colorimétrica se preparó en buffer de fosfato de Potasio potasio 50mM; 100µL de cada muestra; o-dianisidina-2HCl (0.167 mg/mL); 0.0005% de H₂O₂. Se toma una lectura inicial de la reacción a 470nm al minuto 1 y una al minuto 15. Se obtiene la diferencia entre ambas lecturas y eso se extrapola con la curva estándar de actividad. Finalmente la actividad obtenida se divide entre el contenido de proteínas determinado para cada muestra y los resultados se presentan como unidades de MPO/µg de proteína.

Ensayo de citocinas en LBA

El ensayo de citocinas se realizó por Bio-Plex (Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay) para detectar simultáneamente los niveles de 23 citocinas en los sobrenadantes de lavados bronquio-alveolares de ratón instilados con 5U/Kg de bleomicina o solución salina. Los sobrenadantes de LBA de ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} fueron concentrados hasta sequedad y resuspendidos en un volumen

final de 50 μ L de agua estéril. La misma cantidad de proteína por muestra se cargó en cada caso previa determinación de su concentración de proteína mediante el reactivo de Bradford. El ensayo con el Bio-plex se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y del kit de análisis de citocinas. Los resultados se muestran como picogramos por mililitro de LBA.

Western-Blot de Tenascina-C

Los pulmones de ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} control e instilados con bleomicina se disgregaron en un politrón en una proporción de 1mL de buffer RIPA (50mM Tris HCL, pH 8, 150 mM NaCL, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS Triton X-100 más inhibidores de proteasas (SIGMA, Saint Louis Missouri) por cada 50g de pulmón dentro de un tubo estéril de fondo redondo. La suspensión fue posteriormente centrifugada a 14000 rpm a 4°C recuperando únicamente la fase intermedia.

En todos los casos la concentración de proteínas fue determinada por el reactivo de Bradford cargando en cada una de las muestras un contenido de 10 μ g para α SMA y 30 μ g para Tenascina-C. Las muestras fueron separadas en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Las proteínas entonces se transfirieron a una membrana PVDF (0.45 μ m, Millipore, Billerica, MA). Después de la transfección las membranas permanecieron bloqueadas con leche libre de grasa al 5% en 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, y Tween 20 0.05% por 1 hora a T.A. Posteriormente las membranas fueron incubadas por toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: anti- α SMA (1:500 Dako, Sigma); anti-Tenascin C (1:100 R&D Systems); anti- β -Tubulin (1:500, Santa Cruz CA). Posteriormente las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 al 0.05% e incubadas con el anticuerpo secundario e incubadas con el anticuerpo secundario HRP-conjugado

(1:10000, SIGMA, Saint Louis, Misuri) por una hora a temperatura ambiente. Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas con un sistema de detección de quimioluminiscencia (Millipore, Billerica, MA) y las imágenes capturadas con el sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Obtención de cultivos primarios

Ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} entre 14 y 16 semanas de edad fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico para la obtención de los cultivos primarios de fibroblastos. Los pulmones fueron extraídos quirúrgicamente para después de ser lavados con solución salina estéril a través de la arteria pulmonar. Bajo condiciones de esterilidad los pulmones fueron reducidos a porciones minúsculas mediante cortes con tijeras estériles e incubados con tripsina-EDTA y medio de cultivo DMEM sin SFB (Suero Fetal Bobino) por 20 minutos. Después del periodo de incubación fue añadida una porción equivalente de medio DMEM con SFB al 10%. La suspensión fue entonces filtrada a través de una gaza estéril y centrifugada por 10 minutos a 16000 rpm. El pellet fue re suspendido en 5 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10%. Las células fueron colocadas en cajas de cultivo celular Falcon T-25 y mantenidas a 37°C y 5% CO₂ en medio DMEM con SFB al 10% para propagación del cultivo. Células MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} de pasajes 4-6 fueron usadas para todos los experimentos.

Análisis de tasa de crecimiento de Fibroblastos

El reactivo de proliferación celular WST-1 fue empleado como indicador de las células metabólicamente activas en los cultivos primarios. Fibroblastos de ratón MMP19+/+ y MMP19-/- en pasaje 4 fueron sembrados en placas de 96 posos a una densidad de 4×10^3 células/poso e incubadas a una temperatura de 37°C y 5% CO₂ en medio de cultivo DMEM con SFB al 10% por toda una noche. A los tiempos indicados los medios de cultivo correspondientes fueron remplazados con medio DMEM fresco sin SFB y con 10µL del reactivo de proliferación WST-1. Después de un periodo de incubación de 2 horas a 37°C y 5% CO₂ el medio fue recuperado para su lectura en una placa de ELISA. La absorbancia del medio fue cuantificada en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450nm usando una longitud de onda de referencia de 620nm. El aumento en la absorbancia para cada muestra fueron tomados como veces sobre la lectura basal tomada de la misma forma el día 0 a la densidad celular inicial de 4×10^3 células/poso.

El crecimiento celular también fue analizado también por el ensayo de proliferación (CyQUANT®, Life technologies, OR). Fibroblastos MMP19+/+ y MMP19-/- fueron incubados en medio DMEM con 2% SFB con o sin 10ng/mL de hMMP19 recombinante (Creative BioMart, NY, USA). La fluorescencia fue determinada en un lector de placas con filtros a 480nmex/520nmem y los resultados fueron mostrados como incremento en la proliferación relativa sobre la lectura basal en el día 0.

Apoptosis de fibroblastos de pulmón

Mediante Citometría de Flujo fue evaluada la resistencia a apoptosis estimulada por esturosporina de los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón. Cultivos primarios de fibroblastos MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} fueron cultivados en cajas de cultivo de 6 pozos a 80% de confluencia y tratadas con DMSO 0.1% solo o con estaurosporina 1 μ M en DMSO disuelto en medio de cultivo DMEM sin SFB en la incubadora a 37°C y 5% CO₂. Los fibroblastos fueron desprendidos con Tripsina -EDTA después de un periodo de 3 horas y resuspendidos en Buffer PBS. De acuerdo con las instrucciones del Kit I de detección de Apoptosis PE Anexina V de BD Pharmigen™ las células fueron teñidas con Anexina V-FITC y Ioduro de propidio. La población de células apoptóticas tempranas fueron aquellas identificadas como Anexina V-FITC positivas/ Ioduro de propidio negativas.

Ensayo de trans migración de fibroblastos

Cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} fueron suspendidos en medio de cultivo DMEM libre de SFB a una densidad de 1.5x10⁵ células/ pozo en la parte superior de la cámara de Boyden preparada con una matriz de colagena-1 (QCM Haptotaxis cell migration assay) o una membrana recubierta con componentes de la membrana basal (BD BioCoat Matrigel Invasion Chambers) y una barrera de 8 μ M. En el caso de la trans migración en colagena-1 los fibroblastos permanecieron en incubación a 37°C y 5% CO₂ por 8 horas, mientras que para las cámaras con matrigel el periodo de incubación fue de 12 horas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cámara inferior contenía 0.3 mL de medio DMEM con o sin 20nG/mL de PDGF-BB (R&D Systems). Después del periodo de incubación los fibroblastos que migraron hacia la cámara inferior fueron teñidos usando la solución de tinción del kit. Posteriormente el

exceso en la tinción fue lavado de acuerdo a las instrucciones del fabricante sumergiendo la cámara en agua destilada. La cámara entonces fue sumergida 10 minutos en la solución de extracción de tinción. La cantidad de fibroblastos que migraron fueron cuantificados a través de la solución de extracción en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 460nm y los resultados se presentan como el porcentaje de células que migraron sobre el control MMP19+/+ en medio DMEM libre de PDGF.

Cuantificación de la síntesis de colágena

La cantidad de colágena fue cuantificada en el medio condicionado de las células usando el ensayo de Sircol (Biocolor, Belfast, UK) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, los fibroblastos fueron sembrados en una placa de 6 pozos a una densidad de 3×10^5 células por pozo y se incubaron durante la noche a 37°C en 5 % de CO_2 en medio DMEM con 10% de SFB. Después, las células se incubaron en medio libre de suero durante 48 horas o con TGF- β a 3ng/ml. Se recogieron y se dializaron con agua desionizada en presencia de inhibidores de proteasas (2M N-etilmaleimida, 100mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 1M de EDTA) y 1% de azida de sodio. Todas las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en 50 μl de agua desionizada y 30 μg de la concentración de proteína fueron utilizados para el ensayo por cada muestra.

Western Blot αSMA

Los fibroblastos de ratones MMP19 +/+ y MMP19-/- fueron sembrados en matraces de cultivo T-25 y crecido a una confluencia del 80%. Después, las células fueron lisadas con buffer RIPA (SIGMA, Saint Louis, MO) siguiendo las

instrucciones del fabricante. Las proteínas (30 µg) fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS y transferidas a membranas de PVDF (0.45 µm, Millipore, Bellerica, MA), se bloquearon con leche sin grasa al 5% (w/v) en PBS, y se incubaron con el anticuerpo correspondiente a 4 ° C durante la noche. Anti-alfa actina de musculo liso (1:500 Dako, Denmark), Anti-ATG4C (SIGMA a9482, Saint Louis, MO), y anti-β-tubulina (1:500 Santa Cruz, CA) que fue utilizado como control de carga. Después del lavado con PBS-Tween 20 0.05% las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a HRP (1:500; SIGMA, Saint Louis, MO) por una hora a temperatura ambiente. Las bandas fueron detectadas utilizando un sistema de detección por quimioluminiscencia (Millipore, Billerica, MA). Las imágenes fueron adquiridas y analizadas con ChemiDoc XRS system (Bio-Rad).

Microarreglos de fibroblastos

Los fibroblastos de ratones MMP19 +/+ y MMP19-/- fueron lisados con QIAzol (Qiagen), y el total de ARN fue extraído y usado como template para la síntesis del ADN complementario de doble cadena. La calidad y la integridad del ARN fueron determinadas por NanoDrop por Bioanalyzer (Agilent Technologies) respectivamente. La reacción a ADNc fue utilizando el kit de Agilent (Low RNA input linear amplification Kit PLUS, one color5184-3523). Después de la purificación y la fragmentación se prepararon alícuotas de cada muestra para hibridarlas con Agilent Whole Human Genome 4 X 44 arrays (G4112F, Agilent Technologies). Después, cada arreglo fue secuencialmente lavado y escaneado por el escaner para microarreglos de Agilent. Las lecturas de cada arreglo fueron extraídas con el programa Agilent Feature extraction 9.5.3. Las sondas con anotaciones fueron extraídas con Entrez Gene ID, y las señales se normalizaron utilizando el método de cyclin LOESSEI análisis de las redes transcripcionales fue hechas usando el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Los datos del microarreglo fueron inscritos a Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) Número de acceso: GSE49643.

PCR-Tiempo Real

Muestras de RNA total extraídas de los cultivos primarios en condiciones basales o estimulados con TGF- β 1, fue transcrito a cDNA mediante el Kit High-Capacity cDNA Reverse transcription (Applied Biosystems, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones de fabricante.

Los ensayos con sondas Taqman fueron para expresión de colágena α 1 tipo I (Mm00801666_g1); para Mmp19 (Mm01159954_g1); para Nidogeno 2 (Nid2; Mm00456212_m1); para Integrina α 11 (Itga11; Mm00723741_m1); para colágena 14a1 (Mm00805269_m1); para Fibronectina tipo 3 dominio 1 (Fndc1; Mm01297904_m1); para Mmp14 (Mm00485054_m1); y 4352930E para el 18s rRNA eucarionte que se utilizo como control endógeno (Applied Biosystems, CA, USA). La amplificación por PCR-Tiempo Real se realizo mediante el uso del ciclador i-Cycler iQ Detection System (Bio-Rad Laboratories). Los resultados de tres diferentes ratones MMP19+/+ y MMP19-/- fueron expresados como la media \pm la desviación estándar de una cuantificación relativa de el gen blanco normalizado con el rRNA 18s. Cada cDNA fue cuantificado por triplicado mediante una solución maestra, Mastermix solution (Applied Biosystems).

Inmunohistoquímica.

El pulmón derecho fue fijado por instilación a presión constante con paraformaldehído al 10% en PBS 1x. A continuación el tejido fue deshidratado en alcohol etílico a diferentes concentraciones (30, 50, 70 y 96%) y finalmente en xilol, por último se embebió el tejido en parafina y se hicieron cortes de 5 μ m. La extensión y grado de de las lesiones, así como el porcentaje de inflamación y fibrosis, fueron evaluados después de la tinción tricrómica de Masson y Hematoxilina- Eosina. Los anticuerpos monoclonales empleados para α -SMA

(1:500 Dako, Sigma); anti-Tenascin C (1:100 R&D Systems) fueron incubados durante toda la noche a 4°C. Posteriormente los tejidos se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con biotina y un complejo estreptavidina-peroxidasa (BioGenex), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para revelar, los tejidos se incubaron con 3-amino-9etil- carbazol (AEC, BioGenex) como cromógeno, en un buffer de acetatos con 0.05% de H₂O₂ y finalmente los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. En algunos tejidos el anticuerpo primario fue remplazado por suero no inmune como control negativo.

RESULTADOS

Determinación de genotipo de ratón

Para la propagación de la cepa donada por el grupo del Dr. López Otín fue necesaria la creación y renovación constante de unidades reproductivas que nos permitieran mediante las cruzas adecuadas aumentar la población de los ratones para abastecer los experimentos necesarios. Los ratones MMP19^{-/-} son viables se reproducen normalmente y se desarrollan sin ninguna anomalía fenotípica. También la evaluación histológica de los pulmones no mostró diferencias entre los ratones Mmp19^{-/-} and Mmp19^{+/+}.

Con objeto de identificar los ratones transgénicos de los silvestres, el DNA obtenido de cada fragmento de cola de ratón fue incluido en una reacción de PCR buscando amplificar el gen de la MMP19 (211 pb) en los ratones MMP19^{+/+} ó el cassette de Noemicina usado para interrumpir la región promotora y los primeros exones del gen en los ratones nulos (327 pb). La reacción de PCR se inició utilizando 100 ng de DNA de cada muestra y los oligonucleótidos referidos en la sección de material y método. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de los fragmentos amplificados separados por electroforesis en un gel de agarosa al 10%.



Figura 1. Gel de Agarosa al 10% donde se muestran los productos de PCR que identifican el genotipo de los ratones. Ratones WT MMP19 (+/+) 211 pb. Ratones K.O. MMP19 (-/-) 327 pb. Los ratones heterocigotos MMP19 (+/-) muestran ambos productos.

Determinación colorimétrica de Hidroxiprolina

Para examinar el papel potencial de la MMP19 en el desarrollo de fibrosis pulmonar, se evaluó la acumulación de colágena como respuesta a la instilación de bleomicina en ratones MMP19+/+ y MMP19-/. Como se muestra en la figura 2, los ratones MMP19-/- desarrollaron lesiones significativamente más extensas a los 21 días posteriores a la instilación en comparación con los ratones MMP19+/+. Las aéreas de epitelización o viabilidad regional características de la fibrosis inducida por bleomicina fueron escasas en los ratones MMP19-/-, sugiriendo un fallo en la reparación de la lesión, tal como se puede apreciar en el daño pulmonar generalizado en las secciones C y E de la figura 2. En contraste con la sección B correspondiente a un ratón MMP19+/+ se pueden apreciar secciones normales de epitelio (flecha negra) así como secciones dañadas por la bleomicina (flecha roja). Los pulmones en los ratones MMP19-/- también muestran una extensa formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y una tinción positiva de α -SMA sugiere que muchos de ellos eran miofibroblastos figura 2, H.

La Hidroxiprolina es un iminoácido que constituye aproximadamente el 12-15% de los aminoácidos que componen la triple hélice de la colágena y cuya prevalencia en otras proteínas es escasa. Los niveles de fibrosis evaluados por el contenido de hidroxiprolina realizados en paralelo a los pulmones observados en la morfología muestran que los ratones MMP19^{-/-} presentan un nivel significativamente mayor de hidroxiprolina que los ratones MMP19^{+/+} ($p < 0.05$ figura 2).

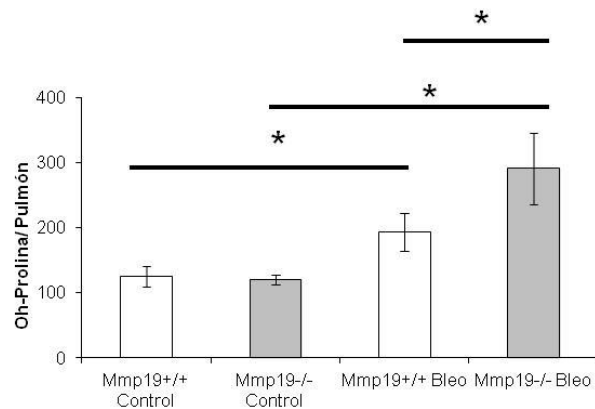
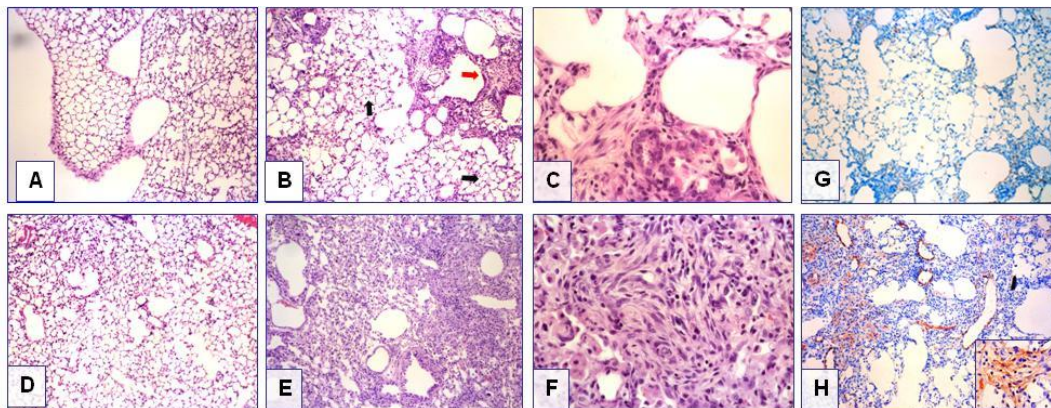


Figura 2. La bleomicina produce una fibrosis pulmonar severa en los ratones MMP19^{-/-}. A – F: Micrografías de secciones pulmonares de ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-}. A y B: ratón MMP19^{+/+}, 21 días instilados con solución salina o bleomicina, teñidas con hematoxilina y eosina (10X). La flecha roja señala una zona estructuralmente dañada por la bleomicina. Las flechas negras indican zonas con estructura epitelial sin daño. C: Ratón MMP19^{+/+}, 21 días después de la instilación con bleomicina (40X). D y E: ratón MMP19^{-/-} 21 días post instilación con solución salina o bleomicina, teñidas con hematoxilina y eosina (10X). F: Ratón MMP19^{-/-}, 21 días después de la instilación con bleomicina (40X). G y H: Inmunotinción para α -SMA en secciones de pulmón de ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-}; la contratinción de las muestras se hizo con hematoxilina (10X). Recuadro: fibroblastos positivos dentro del foco de fibroblastos (40X). Parte inferior: Niveles de hidroxiprolina en ratones MMP19^{-/-} y sus contrapartes MMP19^{+/+} después de la instilación con bleomicina; los resultados se presentan como el promedio \pm la desviación estándar de 6 ratones de cada genotipo ; * $p < 0.05$.

Tenascina-C en Pulmón de ratón

Una vez determinado el contenido de colágena en pulmón como resultado de las lesiones fibróticas, se analizó y comparó la presencia de tenascina C, una glicoproteína que se expresa durante la remodelación tisular y uno de los sustratos conocidos de la MMP19. Como se muestra en la figura 3, existe un aumento en la tenascina-C 21 días después de la instilación con bleomicina en ambos ratones. Sin embargo, la concentración de tenascina-C en pulmones de ratones MMP19^{-/-} es significativamente mayor en comparación al ratón MMP19^{+/+} examinado por Western-blot e inmunohistoquímica ($p < 0.02$ Figura 3 B). Las micrografías muestran acumulación de la tenascina-C en pulmón de ratones MMP19^{+/+} (C) y MMP19^{-/-} (D) instilados a 21 días.

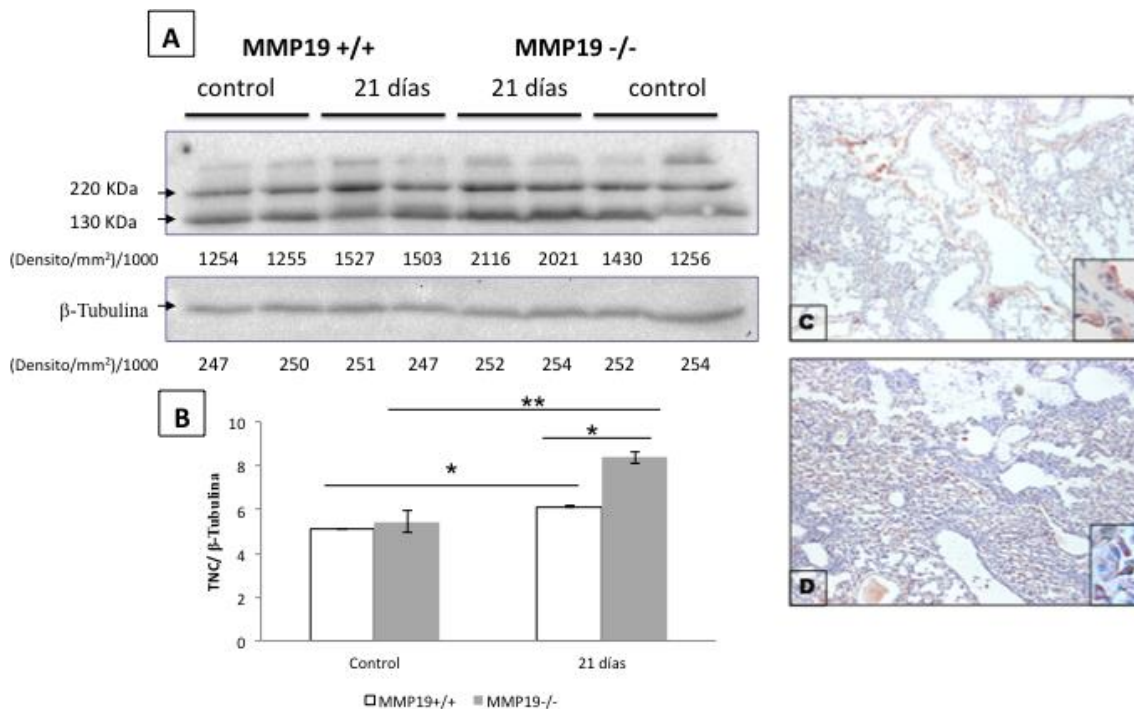


Figura 3. La Tenascina-C se encuentra incrementada en ratones MMP19^{-/-} instilados con bleomicina. Pulmones de ratones control e instilados a 21 días fueron homogenizados con buffer de lisis RIPA para ser analizados por Western-blot. B: El análisis de densitometría de las bandas de Tenascina-C fue normalizado con β -tubulina. Los resultados se presentan como el promedio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes * $p < 0.01$; ** $p < 0.02$. Los paneles C y D muestran una evaluación inmunohistoquímica de la Tenascina-C en ratones MMP19^{+/+} (C) y MMP19^{-/-} (D). Las micrografías muestran secciones representativas de 3 ratones MMP19^{+/+} y 3 ratones MMP19^{-/-}.

Estudio de células inflamatorias en LBA de ratones instilados con Bleomicina

El modelo de bleomicina tiene una fase inicial inflamatoria previa al desarrollo de las lesiones fibróticas que se analizó inicialmente con el conteo de células inflamatorias presentes en LBA de ratones a los 7 días post bleomicina. Se instilaron 20 ratones (10 MMP19^{+/+} y 10 MMP19^{-/-}). El número total de células presentes en LBA se determinó por un conteo con hemocitómetro, mostrando que los ratones MMP19^{+/+} presentaban un número significativamente mayor de células en comparación con los ratones MMP19^{-/-} ($p < 0.01$, figura 4). El conteo diferencial de células en LBA determinó que los ratones MMP19^{+/+} tienen un porcentaje significativamente mayor de neutrófilos en LBA en comparación con los ratones MMP19^{-/-} 7 días después de la instilación (figura 4). Por otro lado, no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de macrófagos y linfocitos en LBA de ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-}. En ninguno de los casos se encontraron Eosinófilos en LBA de ratones MMP19^{+/+}, mientras que en los ratones MMP19^{-/-} se encuentran presentes en muy bajo porcentaje. No se encontró diferencia al comparar entre sí a los ratones a 21 días posteriores a la instilación.

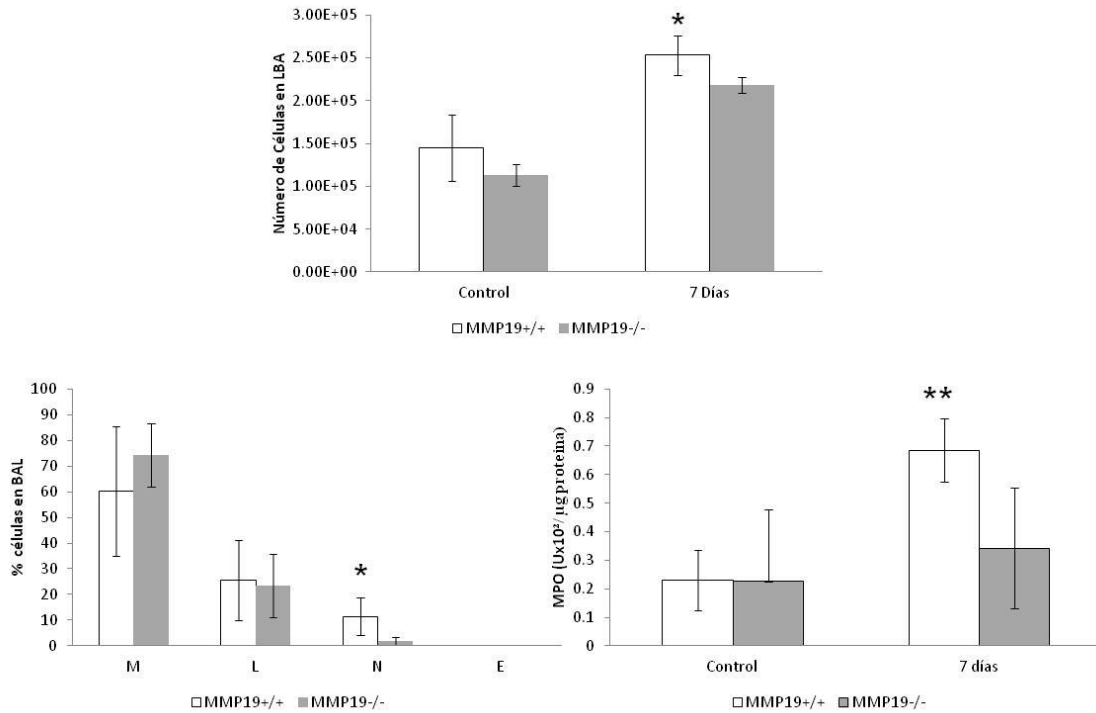


Figura 4. Conteo total, diferencial y de la actividad de Mieloperoxidasa (MPO) en lavado bronquioalveolar (LBA). A: Conteo total de células de ratones MMP19+/+ y MMP19-/- instilados a 7 días (n=7). B: Conteo diferencial de células en LBA. M=macrófagos; L=linfocitos; N=neutrófilos; E=eosinófilos; (n=7). C: Actividad de Mieloperoxidasa en LBA de ratones MMP19+/+ y MMP19-/- (n=4). Los resultados se presentan como el promedio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes *p<0.01; **p<0.02

Ensayo de actividad de Mieloperoxidasa en ratones instilados a 7 días

Con la finalidad de verificar si la actividad de los neutrófilos era mayor en los ratones MMP19+/+ instilados a 7 días se determinó la actividad de la enzima MPO presente en los neutrófilos en LBA de ratones. La actividad de la MPO fue determinada a partir de una curva estándar de actividad de MPO con enzima purificada (Sigma-Aldrich). La lectura obtenida se extrapola con la curva estándar de actividad y finalmente la actividad obtenida se divide entre el contenido de proteínas en la muestra y los resultados se presentan como unidades de MPO/ μ g de proteína. Los resultados de la actividad de MPO confirman las observaciones realizadas previamente en el conteo diferencial de células inflamatorias en LBA.

Los ratones MMP19^{-/-} presentan menor actividad de MPO en LBA en ratones instilados 7 días (figura 4).

No se encontró diferencia significativa en la actividad de MPO en lisados de pulmón entre ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} aunque se observa una tendencia a un comportamiento similar al LBA.

Análisis de citocinas en lavado bronquio-alveolar de ratones instilados

Una vez confirmado que la presencia de neutrófilos y células inflamatorias en general era mayor en los ratones MMP19^{+/+} instilados a 7 días, se realizó un análisis de citocinas presentes en LBA de ratones instilados que nos permitiera explicar las causas de estas diferencias. Mediante un ensayo de bio-plex, el cual permite analizar varias moléculas de una sola muestra mediante una lectura en fluidos tipo ELISA, se analizó la presencia de 23 citocinas en lavado bronquio-alveolar de ratones MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} control e instilados a 3 y 7 días. Se encontró diferencia significativa al comparar dos quimiocinas que atraen neutrófilos. Mientras que los niveles de MIP-1 α disminuyen significativamente en los ratones MMP19^{-/-} a los 3 y 7 días después de la instilación con bleomicina (figura 5, A), KC aumenta sus niveles significativamente, sin que esto favorezca el reclutamiento de neutrófilos en los ratones MMP19^{-/-} / (figura 5, B). Por el contrario, en el caso de los ratones MMP19^{+/+}, MIP-1 α no disminuye significativamente en los ratones instilados y KC disminuye drásticamente sus niveles en comparación con los ratones instilados solo con solución salina.

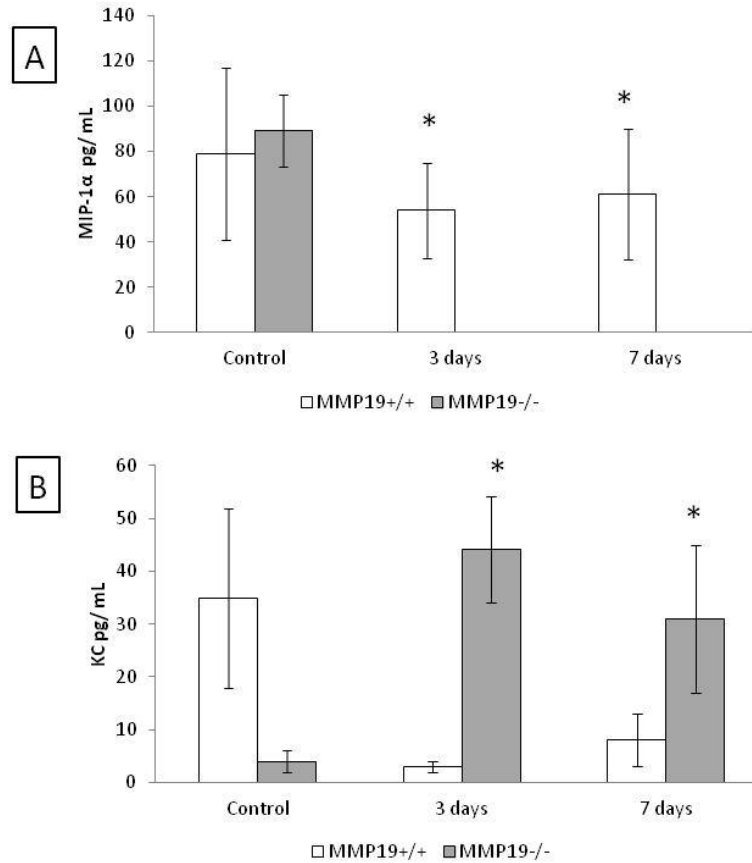


Figura 5 . Análisis de citocinas en LBA de ratón. A: Niveles de MIP-1α en LBA de ratones MMP19+/+ y MMP19-/- control e instilados a 3 y 7 días con bleomicina (n=3-4). B: Niveles de KC en LBA de ratones control e instilados a 3 y 7 días (n=3-4). Los resultados se presentan como el promedio ± la desviación estándar *p<0.01.

Expresión de la MMP19 en fibroblastos de pulmón de ratón

Se evaluó por PCR en tiempo real si los fibroblastos de pulmón de ratones MMP19+/+ y MMP19-/- expresan este gen en condiciones basales. Como se muestra en la figura 6, Mmp19 se expresa en los fibroblastos MMP19+/+, mientras que, como era de esperarse, en los fibroblastos MMP19-/- el gene se encuentra ausente.

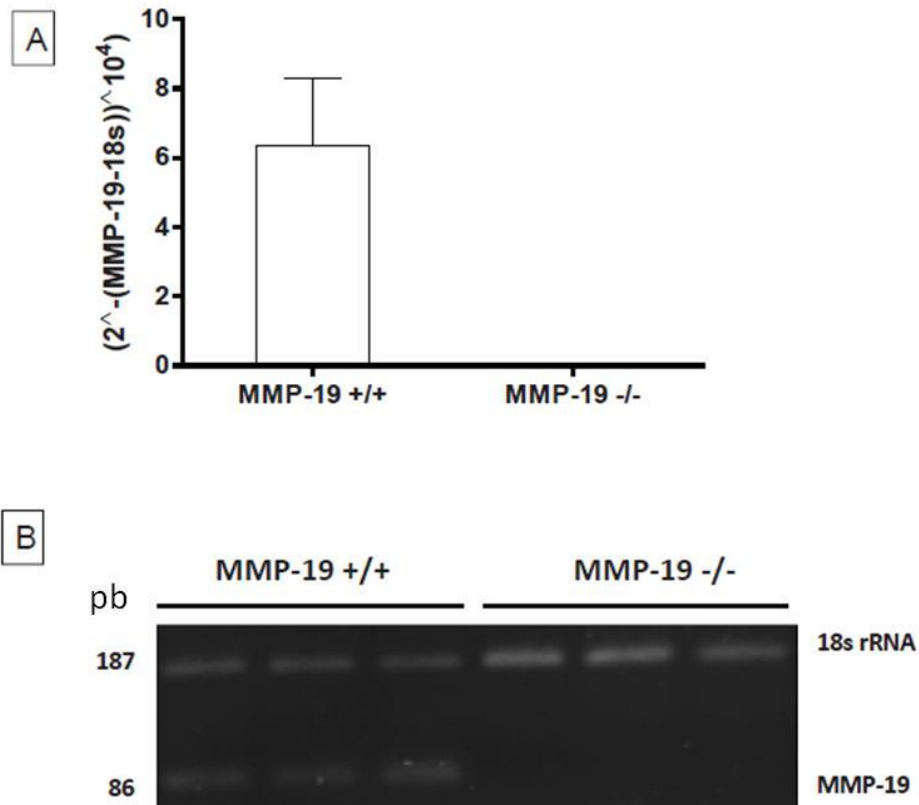


Figura 6. Expresión de MMP19 en fibroblastos MMP19+/+ y MMP19-/. La expresión de MMP19 se evaluó por qRT-PCR (A) y RT-PCR (B) en tres diferentes cultivos primarios de cada genotipo. Cada cDNA se cuantificó por triplicado.

Análisis de Microarreglos

Con la intención de tener mayor información sobre cómo la MMP19 podría intervenir en la afectación de los fenotipos profibróticos observados en los cultivos primarios, se realizó un análisis global de expresión de genes. Mediante la plataforma de alineación de todo el genoma humano (G4772F), se examinó la expresión de genes en cultivos primarios de fibroblastos MMP19+/+ y MMP19-/- (tres cultivos en cada caso). Bajo condiciones basales; 840 genes se encontraron diferencialmente expresados en por lo menos dos veces, 456 con un grado menor

de sobre expresión y 384 presentaron una menor expresión (ver tabla 1, 2 en anexo).

Los fibroblastos MMP19^{-/-} mostraron un incremento significativo en genes asociados con proteínas secretoras, de las cuales muchas de ellas eran componentes fibrilares de la matriz extracelular, fibras-asociadas, colágenas fibrilares de la membrana basal, tales como, ColXIV α 1, ColXXVIII α 1, ColVII α 1, ColIV α 6, ColXI α 1 y ColI α 1. Dos miembros de la las Metaloproteinasas ADAMTS (ADAMTS-2, 3) que están involucradas en el procesamiento de colágena también se encuentran sobre expresadas. Otros genes de MEC aumentados fueron fibulina 5, fibulina 7, CCN3 nefroblastoma sobre expresado, nidogeno 2, osteoglicina, podocan, y fibronectina tipo III dominio 1.

Hubo un modesto incremento en la expresión de MMP-14 (3 veces/ MMP19^{+/+}, ver Tabla 1 en anexo). La MMP-14 es una MMP de unión a membrana (MT1-MMP), sin que ningún otro miembro de la familia de las MMPS se sobre expresara, indicando que no hubo compensación por la falta de MMP19. Varios genes cadena pesada de Miosina se encontraban altamente sobre expresados en los fibroblastos MMP19^{-/-}, sugiriendo que un porcentaje importante de ellos eran miofibroblastos.

Se corroboró por RT-PCR cuantitativo el nivel de expresión de varios genes expresados diferencialmente. Como se muestra en la figura 7, Col 14 α 1, Itga11, Nid2, Mmp14 y Fn timer 1 se encontraban significativamente sobre expresados en condiciones basales en los fibroblastos Mmp19^{-/-}. Con la intención de examinar si la adición de MMP19 recombinante modificaba la expresión de los genes sobreexpresados, fibroblastos de ratón MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} fueron incubados en medio libre de suero con o sin la proteína recombinante (200 ng/mL por 18 hrs).

Como se muestra en la figura 7, la adición de la MMP19 no modifica la expresión de Col 14 α 1, Itga 11, Nid 2, Mmp14 y Fncl 1 en los fibroblastos MMP19+/+. En contraste, en los ratones MMP19-/- la proteína recombinante redujo significativamente la expresión de los genes (figura 7).

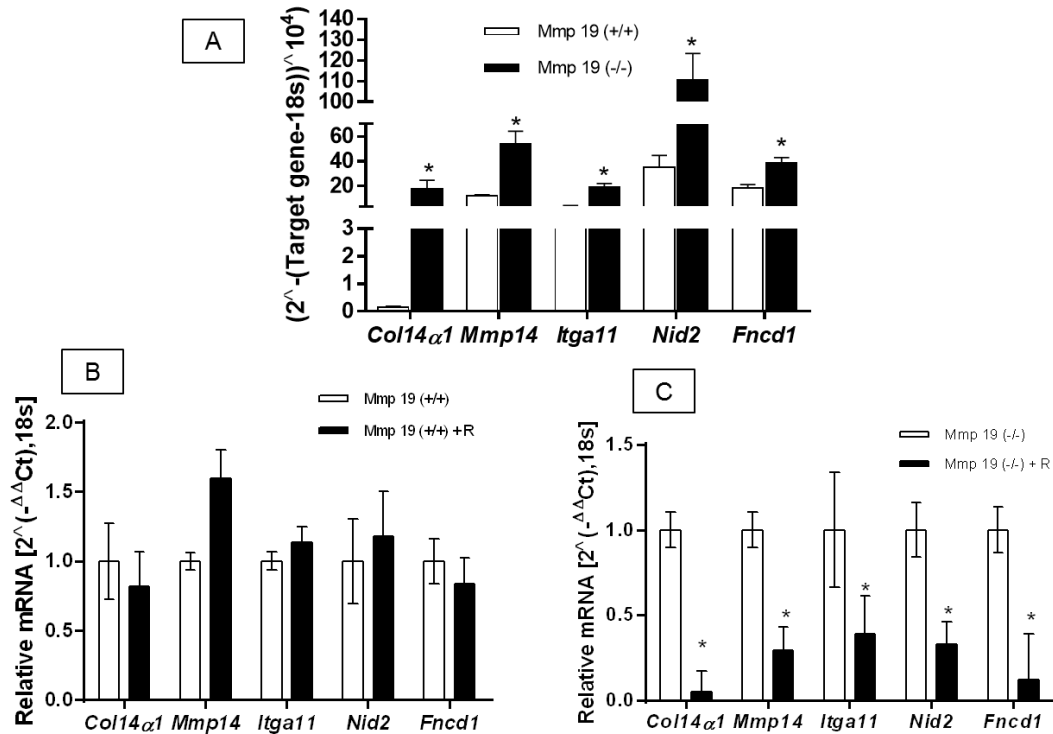


Figura 7. Expresión de genes en fibroblastos MMP19+/+ y MMP19-/. A: expresión de α -I colágena XIV, nidogeno 2, el dominio contenedor I de fibronectina tipo III, integrina α 11, MMP 14, el mRNA fue evaluado por qRT-PCR. La expresión fue normalizada contra el nivel de expresión de 18S rRNA. B y C: Fibroblastos Mmp19+/+ y Mmp19-/+ se incubaron con y sin MMP19 recombinante (200ng/mL) por 18 hrs. Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar de tres cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón de cada genotipo por triplicado. *p<0.01

Expresión y síntesis de colágena

Con la intención de evaluar los efectos de la ausencia de MMP19 en la producción de Matriz, se midió la expresión y producción de colágena I por RT-PCR y ensayo de Sirlcol respectivamente. Como se muestra en la figura 8, bajo

condiciones basales, los fibroblastos de pulmón de ratón MMP19^{-/-} mostraron un nivel de expresión significativamente mayor para el gen de la α -1-Colágena 1 ($p < 0.001$). Consistente con los altos niveles de mRNA, altos niveles de la proteína colágena fueron detectados en los sobrenadantes del cultivo celular ($p < 0.05$) figura 8. Resultados similares se obtuvieron cuando los fibroblastos de pulmón fueron estimulados con 3 ng/mL de TGF- β .

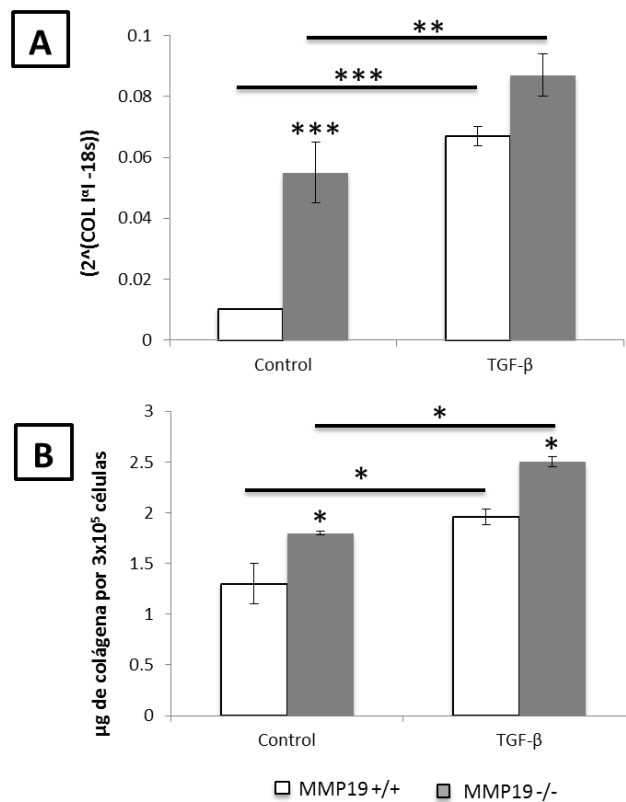


Figura 8. Expresión de colágena en fibroblastos MMP19^{+/+} y MMP19^{-/-} en condiciones basales y en respuesta a TGF- β . A: qRT-PCR de α -I colágena I, la expresión fue normalizada contra el gen 18S rRNA. B: Concentración de colágena en medio condicionado cuantificado por el ensayo de Sircol. Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar de tres cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón de cada genotipo por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Expresión de alfa actina de musculo liso α SMA

La diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, la cual por lo general se evalúa de acuerdo a la expresión de α SMA, desempeña un papel importante en la remodelación tisular. Por tal razón, se evaluó si la ausencia de la expresión del gen de la Mmp19 había afectado este proceso. Un lisado de proteínas derivado de fibroblastos MMP19+/+ y MMP19-/- fueron analizados por Western-blot para la detección de α SMA. Como se muestra en la figura 9, el ratón MMP19-/- espontáneamente expresa una cantidad mayor de α -SMA comparado con los ratones MMP19+/+ ($p < 0.05$). Después de una estimulación con TGF- β 1, un conocido inductor de la diferenciación a miofibroblastos, ambos, MMP19+/+ y MMP19-/-, mostraron incremento significativo en la α SMA

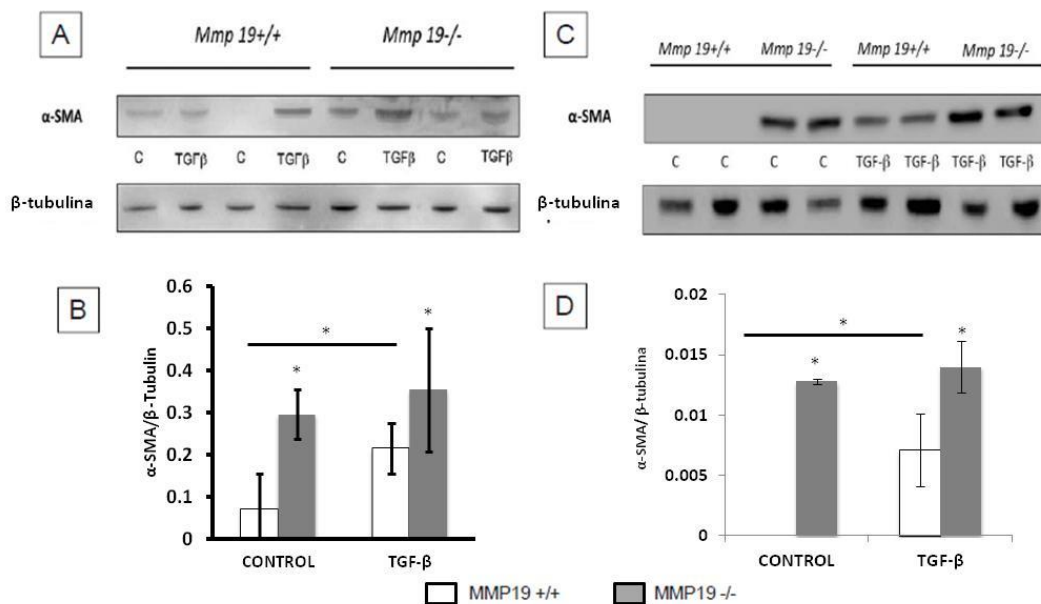


Figura 9. Expresión de α -SMA por fibroblastos MMP19+/+ y MMP19-/. A y C: Western-blot de α -SMA y β -Tubulina como control de carga de cuatro cultivos primarios de fibroblastos de cada genotipo. B y D: Análisis de densitometría; Cada barra representa el promedio \pm la desviación estándar de dos cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón de cada genotipo. * $p < 0.05$

Ensayo de Tasa de crecimiento de Fibroblastos de pulmón de ratón

La proliferación de los fibroblastos que han migrado hacia las zonas fibróticas es uno de los procesos principales que median la fase fibrótica del modelo experimental. Para evaluar si este proceso se encontraba alterado se evaluó la tasa de crecimiento celular con el reactivo de proliferación celular WST-1. Las sales de Tetrazolio del reactivo WST-1, son cortadas por la deshidrogenasa mitocondrial a formazán. Un aumento en la cantidad de colorante de formazán directamente correlaciona con el número de células metabólicamente activas en el cultivo.

Como se ve en la figura 10, cultivos primarios de fibroblastos MMP19^{-/-} cultivados en medio DMEM con 10% SFB presentan una tasa de crecimiento significativamente mayor evaluadas por el ensayo de WST-1, en comparación con fibroblastos MMP19^{+/+} desde el segundo día * $p < 0.05$ a 48 hrs; ** $p < 0.01$ a las 72 y 96 hrs.

También se evaluó la proliferación celular por el ensayo de CyQUANT® en fibroblastos cultivados en medio DMEM con 2% de SFB en la presencia o ausencia de la proteína recombinante MMP19 (100ng/mL). Como se muestra en la figura 10 la proteína recombinante significativamente reduce la proliferación celular a las 72 hrs en los fibroblastos MMP19^{-/-}, mientras que no tiene efecto en los fibroblastos MMP19^{+/+}.

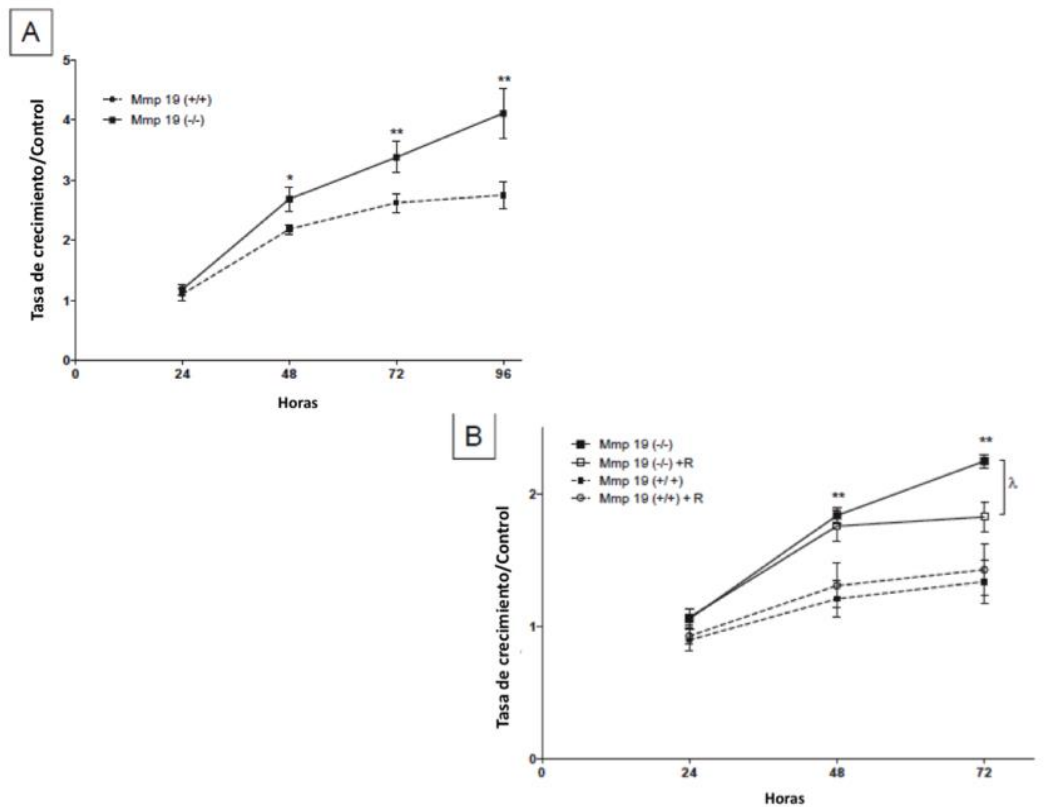


Figura 10. Análisis de tasa de crecimiento. A: Fibroblastos de pulmón de ratón MMP19+/+ y MMP19-/- (cinco de cada genotipo) se sembraron en placas de 96 posos en medio DMEM suplementado con 10% SFB para analizar la tasa de crecimiento por en ensayo de WST-1. B: Fibroblastos de pulmón de ratones MMP19+/+ y MMP19-/- (tres de cada genotipo) se sembraron en medio DMEM suplementado con 2% SFB con o sin la proteína MMP19 recombinante (100ng/mL) para evaluar la proliferación por el ensayo de CyQUANT®. Cada punto representa el promedio \pm la desviación estándar de diferentes cultivos primarios de fibroblastos de cada genotipo por triplicado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $\lambda < 0.05$

Ensayo de Apoptosis

Una vez que el daño en las lesiones fibróticas ha iniciado la remodelación tisular, los fibroblastos presentes en dichas lesiones entran en apoptosis, por lo que la resistencia a la apoptosis es un mecanismo negativo en la resolución de las lesiones fibróticas que pudiera estar presente en el modelo experimental. Se utilizó

el Kit I de detección de Apoptosis PE Anexina V de BD Pharmigen™ en tres cultivos primarios de fibroblastos de ratones MMP19+/+ y tres más de fibroblastos de ratones MMP19-/- para evaluar la resistencia a apoptosis mediada por estaurosporina mediante citometría de flujo (FACS). La Anexina V es usada para determinar cuantitativamente el porcentaje de células que se encuentra en estado apoptótico temprano antes de que la membrana celular pierda su integridad. 7-Amino-Actinomicina (7-AAD) es usada en este Kit para distinguir las células que ya se encuentran en apoptosis tardía, necrosis, o células que ya se encuentran muertas. Para cada línea celular se proporciona al citómetro de flujo una población de 100 000 células a partir de las cuales se seleccionan 10 000 células para evaluar los porcentajes que corresponden a cada condición. No se encontró diferencia en el porcentaje de fibroblastos en apoptosis mediado por estaurosporina al comparar los cultivos primarios MMP19+/+ y MMP19-/- figura 11.

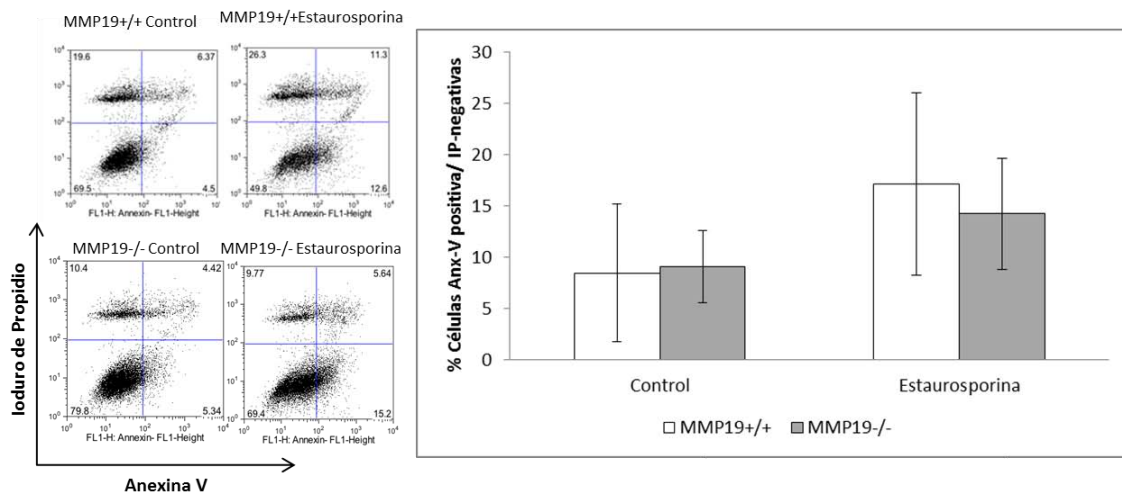


Figura 11. La apoptosis de fibroblastos no se altera por la ausencia de la MMP19. Cultivos primario de fibroblastos de pulmón de ambos genotipos fueron evaluados por citometria de flujo en condiciones basales y estimulados por Estaurosporina. Cada barra representa el promedio \pm la desviación estándar de tres cultivos primarios de fibroblastos de cada genotipo.

Ensayo de trans migración en matriz

Para analizar los efectos de la ausencia de la MMP19 en la migración de los fibroblastos se utilizaron cámaras boyden con matriz de colágena o matrigel. La migración fue evaluada en presencia o ausencia del factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF-B), un mediador quimiotactico de fibroblastos. Como se ve en la figura 12, la trans migración de fibroblastos a través de colágena I fue significativamente mayor en fibroblastos MMP19^{-/-} comparado con fibroblastos MMP19^{+/+}, ya sea espontáneamente ($p < 0.01$) o en presencia de PDGF-B ($p < 0.01$). La misma tendencia se observó cuando se evaluó la trans migración a través de matrigel, en ambos casos en condiciones basales y con PDGF.

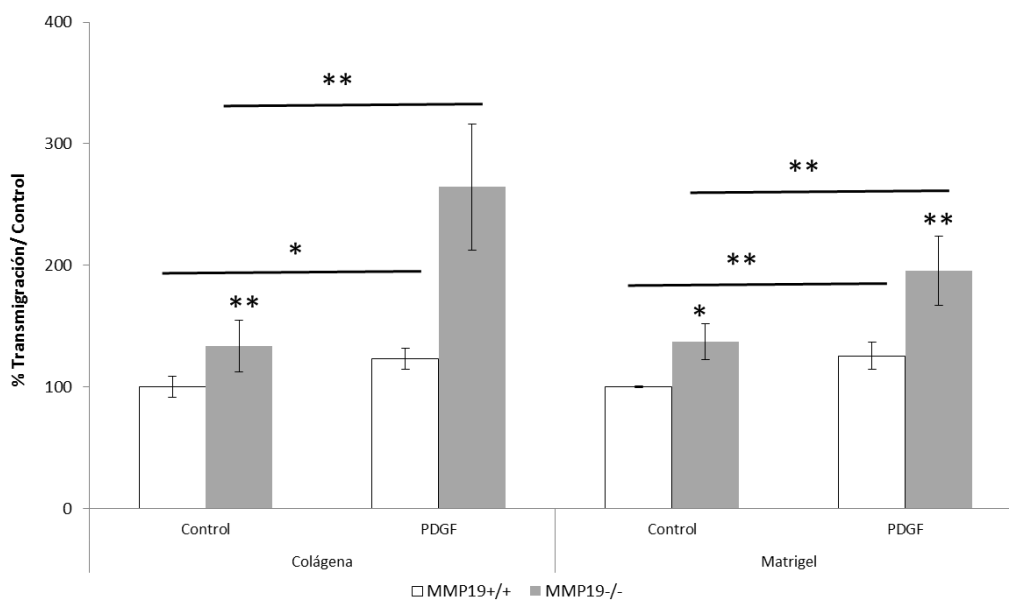


Figura 12. Trans migración a través de componentes de la Matriz Extracelular. Fibroblastos fueron sembrados en cámaras Boyden revestidas con colágena o matrigel y las células que migraron fueron cuantificadas después de 8 o 24 hrs de incubación respectivamente en presencia de PDGF. (20ng/mL). Cada barra representa el promedio \pm la desviación estándar de seis cultivos primarios de fibroblastos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

DISCUSION

La FPI en un padecimiento progresivo y letal, se caracteriza por una activación aberrante de las células epiteliales alveolares seguido por la migración/proliferación de las células mesenquimales; diferenciación a miofibroblastos; y acumulación excesiva de MEC principalmente colágenas fibrilares. La reacción pulmonar fibrótica es probablemente el resultado final de una compleja interacción entre factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas y varias Metaloproteinasas de Matriz que contribuyen a la patogénesis de la FPI, pero sus papeles específicos no están caracterizados del todo.

Estudios en pulmones completos de genes y proteínas con FPI han demostrado que algunas MMPs, incluyendo MMP7, MMP1, MMP2, MMP9 y MMP3, se encuentran altamente sobreexpresadas (2, 43, 48, 96). En un estudio previo utilizando Captura laser con microscopio (LCM, laser capture Microscope), donde sólo se incluyeron unas pocas MMPs, se encontró que las MMPs, MMP9 y MMP7 se encontraban sobreexpresadas en el epitelio adyacente a los focos de fibroblastos (97). MMP1 y MMP7 han sido propuestas como potenciales marcadores biológicos de sangre periférica en la FPI (98) y que la MMP7 se encuentre aumentada en el plasma se toma como factor predictivo de un significativo pronóstico agravado en la FPI (99). Curiosamente, estas enzimas han demostrado una localización epitelial en diversas áreas de los pulmones con FPI, lo que sugiere existen diferentes eventos que se están produciendo en las regiones epiteliales y en el tejido conjuntivo circundante.

Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que la MMP19, una MMP que muestra algunas condiciones únicas en patrones de expresión y

características funcionales, se encuentra aumentada en células epiteliales hiperplásticas adyacentes a regiones fibróticas en pulmones de pacientes con FPI (93).

La MMP19 es una Metaloproteinasas de matriz relativamente poco estudiada que presenta una serie de características estructurales y funcionales únicas, así como un patrón de expresión distinto de otras MMPs. Difiere de otras MMPs por una secuencia C-terminal de 36 residuos de rica en treonina rio abajo de la cisteína conservada que generalmente se encuentra en el extremo carboxilo-terminal (82, 87). La MMP19 es capaz de hidrolizar diversos componentes de la MEC, tales como agricano, proteína de matriz oligomérica del cartílago (COMP), fibronectina, así como proteínas de la membrana basal, laminina-5 γ 2, nidógeno y colágena tipo IV (90, 92) todas presentes en la matriz fibrótica. Se ha demostrado que la MMP19 es capaz de cortar IGFBP3 (100) una molécula aumentada en la FPI y en otros trastornos fibróticos (101) así como para cortar Tenascina-C, un componente de MEC presente en el modelo de fibrosis pulmonar por bleomicina (102). Similar a nuestra observación, en ratones MMP19^{-/-} expuestos a bleomicina, también se observó una exagerada acumulación de Tenascina-C (figura 3) en ratones MMP-19^{-/-} expuestos a un modelo de asma. En apoyo a esto, también se observó que la MMP19 induce la expresión en células epiteliales alveolares de cicloxigenasa (COX2), enzima responsable de la síntesis de prostaglandina E2, un potente mediador antifibrótico (93). Cabe resaltar que ratones MMP19^{-/-} desarrollaron una encarecida inflamación eosinofílica alérgeno-inducida de las vías respiratorias y un cambio en la inflamación impulsado por Th2 (103) es consistente con los efectos que tiene PTGS2 sobre las células dendríticas (104).

MIP-1 α es un miembro de la subfamilia CC de quimiocinas. Se ha reportado como un quimio atrayente de neutrófilos y eosinófilos (105). Su receptor (CCR1) es un GPCR, y es expresado primariamente por linfocitos T,

monocitos/macrófagos, basófilos, células dendríticas, eosinófilos y neutrófilos (106). Un estudio reportó que en presencia del receptor de MIP-1 α , en ratones WT para este receptor existe un reclutamiento efectivo de neutrófilos tanto en un modelo de humo de cigarro como uno de infección por paramyxovirus (105,106). En ambos casos, en ausencia de este receptor en un ratón nulo existe un bajo nivel de MIP-1 α en LBA y una reducida inflamación con bajo reclutamiento de neutrófilos (106). Estos dos estudios concuerdan con las observaciones que tenemos, pues MIP-1 α se encuentra en condiciones basales tanto en los ratones MMP19 $^{+/+}$ como en los ratones MMP19 $^{-/-}$, sin embargo, tras la instilación con bleomicina, los niveles de MIP-1 α en los ratones MMP19 $^{-/-}$ disminuyen, resultando en un pobre reclutamiento de neutrófilos. Por otro lado, los niveles de MIP-1 α se mantienen en los ratones MMP19 $^{+/+}$, permitiendo el reclutamiento de neutrófilos (figuras 4, 5).

La citocina KC es secretada principalmente en macrófagos residentes en tejidos controlados por la estimulación de TLRs (TLR2, TLR3 y TLR4 dependiendo del patógeno), quienes directamente controlan la síntesis de quimiocinas atrayentes de neutrófilos esenciales para el reclutamiento temprano en la respuesta inmune (107). En un modelo de ratones fumadores se encontró que los niveles de KC aumentaban tras la exposición al humo del tabaco, sin que esto favorezca el reclutamiento de neutrófilos. A pesar de que KC se considera el homólogo murino de IL-8, en el ratón aumenta, a consideración de los autores, como un efecto compensatorio en el reclutamiento de neutrófilos en respuesta al daño. (106). Nuestros resultados apuntan nuevamente en el mismo sentido, pues los niveles de KC en los ratones MMP19 $^{+/+}$, que sí tienen un reclutamiento de neutrófilos son bajos. Problemas en la redacción. Por otro lado, en los ratones MMP19 $^{-/-}$, al haber una disminución de MIP-1 α y un pobre reclutamiento de neutrófilos aumenta, en lo que pareciera ser un intento compensatorio de reclutar más neutrófilos al pulmón sin que esto se equipare al nivel de los ratones MMP19 $^{+/+}$ (figuras 4,5).

En nuestra colaboración para el artículo (93), demostramos que la MMP19 induce PTGS2 (también conocido como COX2). PTGS2 es una enzima reguladora clave en el la síntesis de las prostaglandinas E2 (PGE2) y D2 (PGD2) (104). PGE2 ha sido largamente considerado como una molécula anti-fibrótica, dado que inhibe la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágena, la migración y la diferenciación de miofibroblastos e induce la apoptosis de fibroblastos (108-110). Los fibroblastos derivados de los pulmones con FPI muestran una deficiencia relativa en la producción de PGE2, así como una reducción en la capacidad de respuesta a PGE2 (111-113). Varios estudios sugieren que la fibrosis inducida por bleomicina incrementa cuando PTGS2 derivada de PGE2 se encuentra baja o ausente (114-116), mientras que otros estudios no observan este efecto en la misma medida (117) o sugieren vías alternativas para la producción de PGE2 (118). En este caso fue importante para nuestros hallazgos que se demostrara que en células epiteliales alveolares, el silenciamiento de MMP19 reduce la resolución de las heridas, mientras que la transfección de MMP19 aumenta la migración celular (93). Esta es la evidencia de que la inhibición de Ptgs2 disminuye en forma dosis dependiente el cierre de la herida en células epiteliales de humanos y felinos (119). Un resultado similar se obtuvo en nuestro estudio (93) donde la inhibición de PTGS2 menguó la transmigración de las células epiteliales a través de matrigel. Por el contrario, la aplicación exógena de PGE2 estimulaba el proceso de cierre de la herida de manera dosis dependiente. La inhibición de PTGS2 sólo en los tiempos iniciales resultó en una inhibición sostenida del proceso de cierre de herida, lo que indica que este mediador participa en los procesos tempranos de reparación de la herida como la expansión y la migración (119). Aunque se ha estudiado poco en las enfermedades pulmonares, PGD2 también parece tener un efecto anti-fibrótico en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (120). Por lo tanto, PTGS2 parece ejercer su efecto anti-fibrótico a través de sus dos productos principales, PGE2 y PGD2.

Mientras que en esta etapa de la investigación no hemos determinado el mecanismo por el cual MMP19 induce PTGS2, en nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* se demuestra que los cambios en la expresión PTGS2 son dependientes de la expresión de MMP19 (93) y que estos cambios se asocian con el efecto anti-fibrótico de la MMP19.

Recientemente se ha reportado que PGE2 induce la expresión de MMP9 en células dendríticas (DC) y que la inducción de MMP9 por PGE2 es requerida para la migración de DC *in vivo* e *in vitro* (121). Estos resultados indican la existencia de una asociación bidireccional estrecha entre algunas MMPs y PTGS2. Por lo tanto, el aumento de expresión de MMP19 (y PTGS2) en las células epiteliales hiperplásicas sugiere una normal, pero insuficiente respuesta para una continua lesión epitelial en los pulmones de la FPI. Las razones para que este proceso de reparación fracase no son claras. Sin embargo, esto podría deberse a una resistencia a la señalización intracelular, así como al estrés celular activo ó un pesado desbalance pro-fibrótico. Si bien las razones de este fallo no son claras, las observaciones evidencian un diverso repertorio de respuestas que muestran las células epiteliales alveolares en consecuencia a las lesiones, lo cual sugiere que el equilibrio de estas respuestas puede desempeñar un papel determinante en el fenotipo del pulmón en los pacientes con FPI.

Se cree que la FPI es el resultado aberrante de un proceso de reparación crónica o recurrente de una lesión epitelial alveolar. Las células epiteliales alveolares que cubren los focos de fibroblastos con la presencia de fenotipos alterados son el rasgo más distintivo en la FPI. En la FPI, el restablecimiento del epitelio intacto después de una lesión, es un componente clave de la curación normal de las lesiones fibróticas. Nuestros resultados sugieren que la expresión de MMP19 por el epitelio es necesaria para la recuperación del epitelio dañado y la supresión de la activación de las células mesenquimales.

En el presente estudio se evaluó la influencia que la deficiencia de MMP19 ejerce sobre diversas funciones relevantes durante la fibrogénesis. Primero se examinaron los diferentes patrones de expresión de los fibroblastos pulmonares procedentes de ratones MMP19^{-/-} en comparación con los fibroblastos pulmonares de los ratones normales MMP19^{+/+} a través de un estudio de microarreglos. Los resultados mostraron que varios genes y vías involucradas en relevantes procesos fibrogénicos, tales como proliferación, migración, síntesis de colágena, interacciones matriz-célula y autofagia se encontraban alterados en los ratones MMP19^{-/-}, confiriéndoles un fenotipo pro-fibrótico.

La proliferación y la migración son dos mecanismos esenciales para la acumulación de fibroblastos en los tejidos dañados durante la respuesta fibrótica, y varios factores de crecimiento involucrados en estos procesos se encontraban alterados en los ratones MMP19^{-/-}. Un ejemplo es la integrina α 11 (ITGA11), un receptor principal de colágena involucrado en la reorganización de colágena, fue una de los genes mas sobre expresados (tabla x 1). De manera importante esta integrina induce la proliferación celular regulando la expresión de miembros de la familia de IGF, y uno de ellos IGF1, conocido como un regulador multifuncional de la proliferación celular, supervivencia y diferenciación para múltiples tipos celulares, se encontraba también sobreexpresado en los ratones MMP19^{-/-} (122). La sobreexpresión de IGF ha sido asociada con un incremento en la fibrogénesis algunos modelos experimentales (123).

Además, recientemente se demostró que ITGA11 es inducida por TGF- β 1 lo que contribuye a la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, un proceso que también se reveló en nuestro estudio, donde fibroblastos MMP-19^{-/-} mostraron mayores niveles de α -SMA una característica importante de los miofibroblastos (124,125). Curiosamente, el proto-oncogén MYCN que se

encuentra alterado en diversos tipos de cáncer, se ha observado que esta sobreexpresado en fibroblastos MMP-19^{-/-}. La sobreexpresión de este gen se ha observado en la proliferación exagerada de fibroblastos asociada con la formación hipertrófica de la lesión fibrótica (126). La regulación positiva de este gen puede estar relacionada con el aumento de SET y MYND proteína contenedora del dominio 3 (Smyd3), una histona metiltransferasa que pueden activar la transcripción de un conjunto de genes río abajo, incluyendo MYCN, y que además también induce la proliferación y migración celular (127). Por otro lado, varios genes que inhiben la proliferación celular se encuentran disminuidos en su expresión.

Es notable que la proteína inducible por interferón, p200, la cual tiene una organización modular que consiste de una (P203) o dos (P202 y P204), 200 motivos de aminoácidos muestran, una actividad antiproliferativa fuertemente disminuida en su expresión (128). Otro gen que de manera interesante se mostraba disminuido fue la metiltransferasa de histonas SUV39H1 cuya proteína la lisina metiltransferasa de histonas 9 de la histona H3 resulta silenciada. Estudios recientes han demostrado que los telómeros en las células SUV39H1^{-/-} son más largos en comparación con los telómeros de células control que no se encuentran modificadas en la actividad de la telomerasa pero probablemente este asociados a la pérdida de la metilación del ADN en regiones subteloméricas (129).

Con base a estos resultados, se evaluó la proliferación de fibroblastos por dos técnicas: la migración por quimiotaxis y quimiocinesis de fibroblastos a través de cámaras de boyden lo cual confirmó que los fibroblastos MMP-19^{-/-} tienen un marcado aumento de las actividades proliferativas y migratorias. Como una prueba de esto, se analizó el efecto de la adición de nuevo de la proteína recombinante MMP19 sobre la expresión génica y la proliferación de fibroblastos. Los niveles de expresión de Col14 1 α , Mmp14, Itga11, Nid2 y Fncl1 que originalmente se

encontraba incrementada en fibroblastos MMP19^{-/-}, se redujo significativamente cuando se añadió el recombinante alcanzando niveles similares a los fibroblastos MMP19^{+/+}. Del mismo modo, la proteína recombinante disminuyó la proliferación celular incrementada de fibroblastos MMP19^{-/-}. Estos resultados indican que las diferencias observadas en el comportamiento de los fibroblastos están específicamente relacionadas con la modificación genética de MMP19.

El depósito de colágena en la lesión resultante de un proceso de cicatrización alterado que se produce en respuesta a la bleomicina, incrementa la producción de proteínas de matriz, principalmente colágenas fibrilares. En este contexto, varias colágenas, incluyendo la colágena tipo I, el prototipo de colágena fibrilar que aumenta en la fibrosis, estaba sobreexpresada en los fibroblastos MMP19^{-/-}. El incremento de colágena $\alpha 1$ tipo I fue corroborado mediante RT-PCR cuantitativo, y el aumento en la secreción de colágenas se corroboró por el ensayo Sircol, un método de fijación de colorante para el análisis de colágenas solubles. Además, varios genes que aumentan la síntesis de colágena se encuentran sobreexpresados en los fibroblastos MMP19^{-/-}, incluyendo la proteína-1 de señalización WNT1-inducible (WISP1). Se ha demostrado que la estimulación de fibroblastos de pulmón de ratón y humano con WISP1 recombinante mejora la producción de componentes de MEC, principalmente colágena tipo I y fibronectina (130), ambas moléculas que se encontraban aumentadas en fibroblastos MMP19^{-/-}.

El análisis de redes de vías mostró que la expresión de colágenas, y MMP14, la única MMP "compensatoria" sobreexpresada, esta probablemente asociada a la activación de la quinasa (ERK) regulada extracelularmente. Otro gen sobreexpresado de manera interesante fue LOXL1, un miembro de la familia de genes de la lisil oxidasa que se encuentran embebidas en la MEC amino oxidasas dependientes de cobre que juegan un papel crítico en la formación de enlaces

cruzados entre colágenas y elastinas, las cuales suelen estar altamente expresado en los procesos fibróticos (131). El aumento en la expresión de colágenas fibrilares y fibras asociadas a colágena, y un miembro de la familia Lox confirman el fenotipo pro-fibrótico de los fibroblastos MMP19^{-/-}.

Nuestros resultados son consistentes con el cambio dramático en la percepción del papel de las MMPs en FPI que ha sucedido durante la última década (132). Aunque tradicionalmente sólo se consideraban antifibróticas debido a sus propiedades de degradación sobre la MEC, las MMPs han surgido en los últimos años como reguladores de una compleja interacción entre moléculas secretadas (factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas), moléculas de la matriz (lamininas y colágenas), y proteínas ancladas a membrana (47). Ahora se encuentra bien aceptado que las MMPs regulan la fibrosis a través de sus efectos sobre los procesos inmunes e inflamatorios, la activación y la migración celular, la cicatrización de heridas, angiogénesis y apoptosis (2, 47, 132).

En conclusión nuestros resultados sugieren que la MMP19 desempeña un papel protector en el desarrollo de la fibrosis pulmonar.

Protege el daño pulmonar:

- Limita la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina *in vivo* reflejado en el contenido de colágena ($p < 0.05$) y tenascina-C ($p < 0.01$) en pulmón de ratones instilados con bleomicina.
- Durante la etapa inflamatoria del modelo experimental se demostró que en presencia de la MMP19 se da un mayor reclutamiento de neutrófilos. Esto evaluado a través del porcentaje de prevalencia de neutrófilos en LBA ($p < 0.01$) su actividad enzimática MPO ($p < 0.02$) y su reclutamiento por quimiocinas clave ($p < 0.01$).

Regula la síntesis de componentes de la MEC:

- *In vitro*, puede regular la expresión de componentes clave de la Matriz extracelular, tales como, colágena α -I, nidogeno 2, el dominio contenedor I de fibronectina tipo III, integrina α 11, MMP 14, ($p < 0.01$).

Participa en procesos clave en fibroblastos para el desarrollo de la FP

- Favorece la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos evaluado por α -SMA en respuesta a TGF- β 1 ($p < 0.05$).
- Favorece la Migración de fibroblastos a través de colágena ($p < 0.01$) y matrigel ($p < 0.01$).
- En ausencia de MMP19 el fenotipo proliferativo de los fibroblastos se favorece ($p < 0.01$).

Estos efectos sobre el comportamiento de los fibroblastos pueden representar un enfoque terapéutico prometedor en la fibrosis pulmonar.

Bibliografía

1. Wynn T, **Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases.** *J. Clin. Invest.* 117:524–529. 2007.
2. Pardo A, Selman M, **Matrix Metalloproteases in Aberrant Fibrotic Tissue Remodeling.** *Proc Am Thorac Soc Vol 3.* pp 383–388, 2006.
3. Morgenthau A, Padilla M, **Spectrum of Fibrosing Diffuse Parenchymal Lung Disease.** *Mount Sinai Journal of Medicine* 76:2-23. 2009
4. Capron F, **New Classification of interstitial lung disease.** *Rev Pneumol Clin* 61(3):133-40. 2005
5. Pardo A, Selman M, **Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis.** *Frontiers in Bioscience* 7: D1743-1761. 2002
6. Cabrera S, **Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar.** *Rev Inst Nal Enf Resp Mex Volumen 19 - Número 1.* 53-61. 2006
7. Chua F, Gauldie J, Laurent G, **Pulmonary Fibrosis Searching for Model Answers.** *Am J Respir Cell Mol Biol Vol 33.* pp 9–13. 2005
8. Matute-Bello G, Frevert C, Martin T, **Animal models of acute lung injury.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L379–L399, 2008
9. Collard HR, King TE Jr, Bartelson BB, et al. **Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 168: 538–542, 2003
10. Bjoeraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, Offord KP, **Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998 157:199-203, 1998
11. Douglas WW, Ryu JH, Schroeder DR, **Idiopathic pulmonary fibrosis. Impact of oxygen and colchicine, prednisone, or no therapy on survival.** *Am J Respir Crit Care Med* 161:1172-1178, 2000
12. Eric B Meltzer & Paul W Noble, **Idiopathic pulmonary fibrosis,** *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3:8 doi: 10.1186/1750-1172-3-8. 2008
13. Dong Soon Kim, Harold R. Collard, Talmadge E. King, Jr, **Classification and Natural History of the Idiopathic Interstitial Pneumonias,** *Proc Am Thorac Soc Vol 3.* pp 285–292, 2006
14. The American Thoracic Society and the European Respiratory Society: **Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. International consensus statement.** *Am J Respir Crit Care Med* 161: 646-664. 2000
15. Huaux F, Louahed J, Hudspith B, Meredith C, Delos M, Renauld JC, et al. **Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18:51-9. 1998
16. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. **The integrin avb6 binds and activates latent TGF b 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis.** *Cell;* 96:319-28. 1999
17. Selman M, King TE, Pardo A. **Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy.** *Ann Intern Med,* 134: 136-151. 2001

18. Selman M, Pardo A. **Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder.** *Respiratory Research*, 3: 1-8. 2002
19. 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*, 166: 173–177. 2002
20. King TE Jr, Schwarz MI, Brown K *et al.* **Idiopathic pulmonary fibrosis: Relationship between histopathologic features and mortality.** *Am J Respir Crit Care Med*, 164: 1025–32. 2001
21. King TE Jr, Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM. **Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: Scoring system and survival model.** *Am J Respir Crit Care Med*, 164: 1171–81. 2001
22. Cavazza A, Rossi G, Carbonelli C, Spaggiari L, Paci M, Roggeri A, **The role of histology in idiopathic pulmonary fibrosis: an update,** *Respiratory Medicine*, doi:10.1016/j.rmed. 2010
23. Agostini C, Carmela Gurrieri C, **Chemokine/Cytokine Cocktail in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.** *Proc Am Thorac Soc Vol 3.* pp 357–363, 2006
24. Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN. **Enhanced IL-1 β and tumor necrosis factor- α release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure.** *J Immunol*, 150:4188–4196. 1993
25. Pan LH, Ohtani H, Yamauchi K, Nagura H. **Co-expression of TNF- α and IL-1 β in human acute pulmonary fibrotic diseases: an immunohistochemical analysis.** *Pathol Int*, 46:91–99. 1996
26. Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. **Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes.** *J Clin Invest*, 82:2026–2037. 1988
27. Raines EW, Dower SK, Ross R. **Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA.** *Science*, 243:393–396. 1989
28. Piguet PF, Vesin C, Grau GE, Thompson RC. **Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica.** *Cytokine*, 5:57–61. 1993
29. Zhang K, Gharaee-Kermani M, McGarry B, Remick D, Phan SH. **TNF- α -mediated lung cytokine networking and eosinophil recruitment in pulmonary fibrosis.** *J Immunol*, 158:954–959. 1997
30. Kuroki M, Noguchi Y, Shimono M, Tomono K, Tashiro T, Obata Y, Nakayama E, Kohno S. **Repression of bleomycin-induced pneumopathy by TNF.** *J Immunol*, 170:567–574. 2003
31. Lundblad LK, Thompson-Figueroa J, Leclair T, Sullivan MJ, Poynter ME, Irvin CG, Bates JH. **Tumor necrosis factor- α overexpression in lung disease: a single cause behind a complex phenotype.** *Am J Respir Crit Care Med*, 171:1363–1370. 2005
32. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. **Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis.** *J Clin Invest*, 107:1529–1536. 2001

33. Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. **TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop.** *Cell*, 63:515–524. 1990
34. Battegay EJ, Raines EW, Colbert T, Ross R. **TNF- α stimulation of fibroblast proliferation: dependence on platelet-derived groMMP19+/+h factor (PDGF) secretion and alteration of PDGF receptor expression.** *J Immunol*, 154:6040–6047. 1995
35. Maeda A, Hiyama K, Yamakido H, Ishioka S, Yamakido M. **Increased expression of platelet-derived groMMP19+/+h factor A and insulin-like groMMP19+/+h factor-I in BAL cells during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.** *Chest*, 109:780–786. 1996
36. Scotton C, Chambers R, **Molecular Targets in Pulmonary Fibrosis: The Myofibroblast in Focus.** *Chest*, 132:1311-1321. 2007
37. HoytDG, Lazo JS. **Alterations in pulmonarymRNAencoding procollagens, fibronectin and transforming groMMP19+/+h factor- β precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.** *J Pharmacol Exp Ther*, 246:765–771. 1988
38. Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. **TGF- β 1, but not TGF- β 2 or TGF- β 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, 14:131–138. 1996
39. Khalil N, Xu YD, O'Connor R, Duronio V. **Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by TGF- β 1 induced release of extracellular FGF-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK.** *J Biol Chem*, 24:24. 2005
40. Hu B, Wu Z, Phan SH. **Smad3 mediates transforming groMMP19+/+h factorbeta-induced alpha-smooth muscle actin expression.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 397–404, 2003
41. Feng XH, Derynck R, **Specificity and versatility in TGF β - signaling through Smads.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21:659–93. 2005
42. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP,Roth M. **Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- β 1 and TGF- β 3.** *Am J Physiol*, 276:L814–L824. 1999
43. 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 nondegradative lung microenvironment?** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279:L562–L574. 2000
44. Ruiz V, Ordonez RM, Berumen J, Ramirez R, Uhal B, Becerril C, Pardo A, Selman M. **Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285:L1026–L1036. 2003
45. Sternlicht M. and Werb Z. **How Matrixmetalloproteinases regulate cell behavior,** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 17: 463–516, 2001.
46. McCawley L, Matrisian L. **Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!** *Curr Opin Cell Biol* 13: 534-540, 2001.
47. Folgueras A, Pendas A, Sanchez L, Lopez-Otin C. **Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies.** *Int J Dev Biol* 48: 411-24, 2004

48. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. **Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6292-6297. 2002.
49. Cabrera S, Gaxiola M, Arreola J, Ramírez R, Jara P, D'Armiento J, Richards T, Selman M, Pardo A. **Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin,** *Int J Biochem Cell Biol* 39(12):2324-38. 2007
50. Garcia-Alvarez J, Ramirez R, Sampieri CL, Nuttall RK, Edwards DR, Selman M, Pardo A. **Membrane type-matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 23:13-21. 2006.
51. Scheid MP, Woodgett JR, **PKB/AKT: functional insights from genetic models,** *Nat Rev Mol Cell Biol,* 2:760–768. 2001.
52. Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang HG, Tsang BK, Cheng JQ, **Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP),** *J Biol Chem,* 279:5405–5412. 2004.
53. Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A, **Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression.** *Am J Respir Cell Mol Biol,* 24:591–598, 2001.
54. Zhang H, Gharaee-Kermani M, Phan SH. **Regulation of lung fibroblast -smooth muscle actin expression, contractile phenotype and apoptosis by IL-1 β .** *J Immunol,* 158:1392–1399. 1997
55. Sem H. Phan, **The Myofibroblast in Pulmonary Fibrosis.** *Chest,* 122 december supplement. 2002
56. Zhang HY, Phan SH. **Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming groMMP19+/+h factor beta(1).** *Am J Respir Cell Mol Biol,* 21:658–665. 1999
57. Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, et al. **Co-expression of α -smooth muscle actin and type I collagen in fibroblast-like cells of rat lungs with bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a combined immunohistochemical and in situ hybridization study.** *Am J Pathol,* 145:114–125. 1994
58. Zhang K, Flanders KC, Phan SH. **Cellular localization of transforming groMMP19+/+h factor- β expression in bleomycininduced pulmonary fibrosis.** *Am J Pathol,* 147:352–361. 1995
59. Mott JD, Werb Z. **Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases.** *Curr Opin Cell Biol.* 16:558-564. 2004.
60. Sternlicht M. and Werb Z. **How Matrixmetalloproteinases regulate cell behavior,** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol,* 17: 463–516, 2001.
61. McCawley L, Matrisian L. **Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!** *Curr Opin Cell Biol* 13: 534-540, 2001.
62. Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, Khaw PT. **Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellularorganelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis.** *Am J Pathol;* 166:1555–1563. 2005.
63. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. **Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury.** *Circulation;* 106: 1543–1549. 2002.

64. Luo D, Mari B, Stoll I, Anglard P. **Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase.** *J Biol Chem*; 277: 25527–25536. 2002.
65. Selman M, Pardo A. **Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of metallo-proteinases in Pulmonary Fibrosis.** J. P. Linch ed. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Marcel Decker, Inc.* pp 451-481, 2004.
66. Reuben P, Cheung H. **Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) gene expression by protein kinases.** *Front Biosci* 11: 1199-1215, 2006.
67. Pardo A, Selman M, **Matrix Metalloproteases in Aberrant Fibrotic Tissue Remodeling,** *Proc Am Thorac Soc Vol 3.* pp 383–388, 2006.
68. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. **Structural properties of matrix metalloproteinases,** *CMLS* 55:639-652, 1998.
69. Visse R, Nagase H. **Matrix and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry,** *Circ Res* 92:827.839. 2003
70. Nagase H, Woessner JF. **Matrix Metalloproteinases,** *J. Biol.Chem* 274:21491-21494. 1999.
71. Greenlee K, Werb Z, Kheradmand F. **Matrix Metalloproteinases in lung: Multiple, Multifarious, and Multifaceted,** *Physiol Rev* 87:69-98, 2007.
72. Thomas G. **Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease.** *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3:753–766. 2002.
73. Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendás AM, Smith B, López-Otin C, Murphy G, Knäuper V. **Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19: Evidence for a role as potent basement membrane degradation enzyme.** *J Biol Chem.*; 275:14809-14816. 2000
74. Nagase H, Visse R, Murphy G. **Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs,** *Cardiovascular Research* 69:562 – 573. 2006.
75. Murphy G, Nagase H. **Progress in matrix metalloproteinase research,** *Mol Aspects Med* 29(5): 290–308, 2008.
76. Mysliwy J, Dingley A, Sedlacek R, Grötzinger J. **Structural characterization and binding propertie of the hemopexin-like domain of the matrixmetalloproteinase-19,** *Protein Expression and PuriWcation* 46:406–413. 2006.
77. García-de-Alba C, Becerril C, Ruiz V, González Y, Reyes S, García-Alvarez J, Selman M, Pardo A. **Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes: possible role in migration and homing,** *Am J Respir Crit Care Med.* Nov 1;182(9):1144-52. 2010
78. Garcia-Alvarez J, Ramirez R, Sampieri CL, Nuttall RK, Edwards DR, Selman M, Pardo A. **Membrane type-matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 23:13-21. 2006
79. Herrera I, Cisneros J, Maldonado M, Ramírez R, Ortiz-Quintero B, Anso E, Chandel NS, Selman M, Pardo A. **Matrix metalloproteinase (MMP)-1 induces lung alveolar epithelial cell migration and proliferation, protects from apoptosis, and represses mitochondrial oxygen consumption.** *J Biol Chem.* 2013 Sep 6;288(36):25964-75, 2013
80. Pardo A, Selman M. **Rol of matrix metaloproteases in idiopathic pulmonary fibrosis,** *Fibrogenesis Tissue Repair Jun* 6;5(Suppl 1):S9. eCollection. 2012

81. Pendas A, Knäuper V, Puente X, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, Lopez-Otin C. **Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution**, *Jour Bio Chem Vol. 272, No. 7 pp. 4281–4286*, 1997.
82. Murphy G, Knäuper V, Cowell S, Hembry R, Stanton H, Butler G, Freije J, Pendás AM, López-Otín C. **Evaluation of some newer matrix metalloproteinases**. *Ann NY Acad Sic 878:25-39*. 1999
83. Hieta N, Impola U, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere,z U, Kaha VM. **Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Dermal Wounds and by Fibroblasts in Culture**, *J Invest Dermatol 21(5):997-1004*. 2003
84. Beck I, Müller M, Mentlein R, Sadowski T, Mueller M, Paus R, Sedlacek R. **Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Keratinocytes Is Repressed by Transcription Factors Tst-1 and Skn-1a: Implications for Keratinocyte Differentiation**, *J Invest Dermatol 127,1107-1114*. 2007
85. Kolb C, Mauch S, Peter HH, Krawinkel U, Sedlacek R. **The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient**, *Immunol Lett 57(1-3) 83-88*. 1997
86. Mueller MS, Harnasch M, Kolb C, Kusch J, Sadowski T, Sedlacek R. **The murine ortholog of matrix metalloproteinase 19: its cloning, gene organization, and expression**, *Gene 256(1-2) 101-111*, 2000
87. Mueller M, Mauch S, Sedlacek R. **Structure of the human MMP-19 gene**, *Gene 252(1-2) 27-37*, 2000
88. Mauch S, Kolb C, Kolb B, Sadowski T, Sedlacek R. **Matrix Metalloproteinase-19 is expressed in myeloid cells in an adhesion-dependent manner and associates with the cell surface**, *J Immunol 168(3); 1244-1251*. 2002
89. Stracke J, Hutton M, Stewart M, Pendas A, Smithi B, Lopez-Otin C, Murphy G, Knauper V. **Biochemical Biochemical Characterization of the Catalytic Domain of Human Matrix Metalloproteinase 19**, *J Biol Chem 275(20); 14809-14816*, 2000
90. Stracke J, Fosangb A, Lastb K, Mercurib, Pendas, Llanoc E, Perrisd R, Di Cesaref P, Murphya G, Knaupera V, **Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP)**, *FEBS Lett 478(1-2); 52-56*. 2000
91. Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Ludwig A, Proksch E, Titz B, Sedlacek R. **Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration**, *Cell Mol Life Sci 62(7-8); 870-880*. 2005
92. Pendás A, Folgueras A, Llano E, Caterina J, Frerard F, Rodríguez F, Astudillo A, Noël A, Birkedal-Hansen H, López-Otín C. **Diet-Induced Obesity and Reduced Skin Cancer Susceptibility in Matrix Metalloproteinase 19-Deficient Mice**, *Mol Cell Biol 24(12); 5304-5313*. 2004
93. Yu G, Kovkarova-Naumovski E, Jara P, Parwani A, Kass D, Ruiz V, Lopez-Otín C, Rosas I, Gibson K, Cabrera S, Ramírez R, Yousem S, Richards T, Chensny L, Selman M, Kaminski N, Pardo A. **MMP19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans**. *Am J Respir Crit Care Med Oct15;186(8):752-762*. 2012

94. Woessner J F, Jr. **The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid.** *Arch. Biochem. Biophys.* 93:440-7, 1961
95. Yamashita CM, Dolgonos L, Zemans RL, Young SK, Robertson J, Briones N, Suzuki T, Campbell MN, Gauldie J, Radisky DC, Riches DW, Yu G, Kaminski N, McCulloch CA, Downey GP. **Matrix metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis.** *Am J Pathol*; 179:1733-1745. 2011
96. Kelly MM, Leigh R, Gilpin SE, Cheng E, Martin GE, Radford K, Cox G, Gauldie J. **Cell-specific gene expression in patients with usual interstitial pneumonia.** *Am J Respir Crit Care Med*; 174:557-565. 2006
97. Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, Lindell KO, Cisneros J, Macdonald SD, Pardo A, Sciruba F, Dauber J, Selman M, Gochuico BR, Kaminski N. **MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis.** *PLoS Med.*; 5:e93. 2008
98. Richards TJ, Kaminski N, Baribaud F, Flavin S, Brodmerkel C, Horowitz D, Li K, Choi J, Vuga LJ, Lindell KO, Klesen M, Zhang Y, Gibson KF. **Peripheral blood proteins predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med.*; 185:67-76. 2011
99. Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R. **Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3.** *Mol Biol Cell.*; 14:4569-4580. 2003
100. Pilewski JM, Henry AC, Knauer AV, Feghali-Bostwick CA. **Insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5 are overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis and contribute to extracellular matrix deposition.** *Am J Pathol.*; 166:399-407. 2005
101. Carey WA, Taylor GD, Dean WB, Bristow JD. **Tenascin-C deficiency attenuates TGF-beta-mediated fibrosis following murine lung injury.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 299:L785-793. 2010
102. Gueders MM, Hirst SJ, Quesada-Calvo F, Paulissen G, Hacha J, Gilles C, Gosset P, Louis R, Foidart JM, Lopez-Otin C, Noël A, Cataldo DD. **Matrix metalloproteinase-19 deficiency promotes tenascin-C accumulation and allergen-induced airway inflammation.** *Am J Respir Cell Mol Biol.*; 43:286-295. 2010.
103. Kalinski P. **Regulation of immune responses by prostaglandin E2.** *J Immunol*; 188:21-28. 2012
104. Smith WL, Langenbach R. **Why there are two cyclooxygenase isozymes.** *J Clin Invest*; 107:1491-1495. 2001
105. Domachowske J, Bonville C, Gao J, Murphy P, Easton A, Rosenberg H. **The Chemokine Macrophage-Inflammatory Protein-1a and Its Receptor CCR1 Control Pulmonary Inflammation and Antiviral Host Defense in Paramyxovirus Infection,** *J Immunol Sep 1*; 165(5):2677-82, 2000
106. Önnervik P, Lindahl M, Svitacheva N, Stämpfli M, Thim K, Smailagic A, Virtala R, Taylor J. **The role of the CCR1 receptor in the inflammatory response to tobacco smoke in a mouse model,** *Inflamm Res Oct*; 59(10); 817-825. 2010
107. De Filippo K, Henderson R, Laschinger M, Hogg N. **Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue**

- Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways**, *J Immunol* 180;4308-4315. 2008
108. White ES, Atrasz RG, Dickie EG, Aronoff DM, Stambolic V, Mak TW, Moore BB, Peters-Golden M. **Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast migration by E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in PTEN activity**. *Am J Respir Cell Mol Biol.*; 32:135-141. 2005
 109. Huang SK, White ES, Wettlaufer SH, Grifka H, Hogaboam CM, Thannickal VJ, Horowitz JC, Peters-Golden M. **Prostaglandin E2 induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathway**. *FASEB J.*; 23:4317-426. 2009
 110. Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB. **Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E-prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation**. *Am J Respir Cell Mol Biol.*; 29:537-544. 2003
 111. Maher TM, Evans IC, Bottoms SE, Mercer PF, Thorley AJ, Nicholson AG, Laurent GJ, Tetley TD, Chambers RC, McAnulty RJ. **Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis**. *Am J Respir Crit Care Med.*; 182:73-82. 2010
 112. Huang SK, Fisher AS, Scruggs AM, White ES, Hogaboam CM, Richardson BC, Peters-Golden M. **Hypermethylation of PTGER2 confers prostaglandin E2 resistance in fibrotic fibroblasts from humans and mice**. *Am J Pathol.*; 177:2245-2255. 2010
 113. Huang SK, Wettlaufer SH, Hogaboam CM, Flaherty KR, Martinez FJ, Myers JL, Colby TV, Travis WD, Toews GB, Peters-Golden M. **Variable prostaglandin E2 resistance in fibroblasts from patients with usual interstitial pneumonia**. *Am J Respir Crit Care Med.*; 177:66-74. 2008
 114. Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Striter RM, Peters-Golden M. **Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesis prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2**. *J Clin Invest.*; 95:1861-1868. 1995
 115. Liu F, Mih JD, Shea BS, Kho AT, Sharif AS, Tager AM, Tschumperlin DJ. **Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression**. *J Cell Biol.*; 190:693-706. 2010
 116. Hartney JM, Coggins KG, Tilley SL, Jania LA, Lovgren AK, Audoly LP, Koller BH. **Prostaglandin E2 protects lower airways against bronchoconstriction**. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 290:L105-113. 2006
 117. Card JW, Voltz JW, Carey MA, Bradbury JA, Degraff LM, Lih FB, Bonner JC, Morgan DL, Flake GP, Zeldin DC. **Cyclooxygenase-2 deficiency exacerbates bleomycin-induced lung dysfunction but not fibrosis**. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 37:300-308.
 118. Bauman KA, Wettlaufer SH, Okunishi K, Vannella KM, Stoolman JS, Huang SK, et al. **The antifibrotic effects of plasminogen activation occur via prostaglandin E2 synthesis in humans and mice**. *J Clin Invest.*; 120:1950-1960. 2010
 119. Savla U, Appel HJ, Sporn PH, Waters CM. **Prostaglandin E(2) regulates wound closure in airway epithelium**. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 280:L421-431. 2001
 120. Ando M, Murakami Y, Kojima F, Endo H, Kitasato H, Hashimoto A, Kobayashi H, Majima M, Inoue M, Kondo H, Kawai S, Hayashi I. **Retrovirally introduced**

- prostaglandin D2 synthase suppresses lung injury induced by bleomycin.** *Am J Respir Cell Mol Biol*; 28:582-591. 2003
121. Yen JH, Kocieda VP, Jing H, Ganea D. **Prostaglandin E2 induces matrix metalloproteinase 9 expression in dendritic cells through two independent signaling pathways leading to activator protein 1 (AP-1) activation.** *J Biol Chem.*; 286:38913-38923. 2011
 122. Zhu CQ, Popova SN, Brown ER, Barysye-Lovejoy D, Navab R, Shih W, Li M, Lu M, Jurisica I, Penn LZ, Gullberg D and Tsao MS. **Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11754-11759, 2007
 123. Sokolovic A, Rodriguez-Ortigosa CM, Bloemendaal LT, Oude Elferink RP, Prieto J and Bosma PJ. **Insulin-like growth factor 1 enhances bile-duct proliferation and fibrosis in Abcb4 (-/-) mice.** *Biochim Biophys Acta* 1832: 697-704, 2013.
 124. Lu N, Carracedo S, Ranta J, Heuchel R, Soininen R and Gullberg D. **The human alpha11 integrin promoter drives fibroblast-restricted expression in vivo and is regulated by TGF-beta1 in a Smad- and Sp1-dependent manner.** *Matrix Biol* 29: 166-176, 2010.
 125. Talior-Volodarsky I, Connelly KA, Arora PD, Gullberg D and McCulloch CA. **Alpha11 integrin stimulates myofibroblast differentiation in diabetic cardiomyopathy.** *Cardiovasc Res* 96: 265-275, 2012
 126. Ramirez G, Hagood JS, Sanders Y, Ramirez R, Becerril C, Segura L, Barrera L, Selman M and Pardo A. **Absence of Thy-1 results in TGF-beta induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts.** *Lab Invest* 91: 1206-1218, 2011
 127. Ren TN, Wang JS, He YM, Xu CL, Wang SZ and Xi T. **Effects of SMYD3 over expression on cell cycle acceleration and cell proliferation in MDA-MB-231 human breast cancer cells.** *Med Oncol* 28 Suppl 1: S91-S98, 2011
 128. Gribaudo G, Riera L, De AM and Landolfo S. **The antiproliferative activity of the murine interferon-inducible Irf 200 proteins depends on the presence of two 200 amino acid domains.** *FEBS Lett* 456: 31-36, 1999
 129. Dang-Nguyen TQ, Haraguchi S, Furusawa T, Somfai T, Kaneda M, Watanabe S, Akagi S, Kikuchi K, Tajima A and Nagai T. **Downregulation of histone methyltransferase genes SUV39H1 and SUV39H2 increases telomere length in embryonic stem-like cells and embryonic fibroblasts in pigs.** *J Reprod Dev* 59: 27-32, 2013.
 130. Konigshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Gunther A and Eickelberg O. **WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis.** *J Clin Invest* 119: 772-787, 2009.
 131. Lopez B, Gonzalez A, Hermida N, Valencia F, de TE and Diez J. **Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H1-H9, 2010.
 132. Pardo A, Selman M, Kaminski N. **Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Int J Biochem Cell Biol.*; 40:1141-1155. 2008

ANEXO

Table 1. Most upregulated genes in *Mmp19*^{-/-} mice lung fibroblasts

Unigene ID	Entrez Symbol	Description	Fold Change	Entrez ID
A_51_P223569	Dfcd4	DFAD (Asp-gln-ala-asp) box polypeptide 4	96	13306
A_21_J239673	Hlprt	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	92	15152
A_55_P2017900	LOC100017411	Similar to gamma-aminobutyric-acid receptor subunit alpha precursor	62	100017411
A_55_J2124736	Col14a1	Collagen, type XIV, alpha 1	49	7372
A_55_J2378186	Kcnma1	Potassium large-conductance calcium-activated channel, subfamily M alpha member 1	40	16331
A_52_P151240	Fam150a	Family with sequence similarity 150, member A	38	620393
A_55_P1853402	Melan A	Melan A	35	77836
A_51_P372303	Angpt4	Angiopoietin 4	34	11602
A_21_P215347	Tgfr2l	Fibroblast growth factor 21	31	96636
A_52_P113537	Xist	Inactive X-specific transcripts	31	213712
A_55_J2107765	Col28a1	Collagen (type XXVIII) alpha 1	30	213915
A_55_P2097219	Glyp1	Glycosylate binding protein 1, interferon inducible	29	2633
A_51_P457196	Sfrp4	Secreted frizzled-related protein 4	28	20379
A_51_P281778	2210010C17Rik	Immunoglobulin superfamily, member 23	26	70000
A_55_P2037585	Tfrc	Transferrin	24	22041
A_55_P2167805	ANK3bp	ANK gene family, member 3 (NFSH)-binding protein	22	130712
A_52_P63905	Ddc	Dopa decarboxylase	19	13195
A_21_J417720	Itga11	Integrin alpha 11	17	219480
A_52_P101990	Hifs1	Histone H1-like protein in spermatic 1	17	54388
A_55_J2142226	Scpm2b1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F	17	238392
A_52_P645862	Agtr1a	Angiotensin II receptor, type 1a	16	11607
A_55_P1972034	Muc16	Mucin 16	16	73732
A_52_P105537	Nsv	Nephroblastoma overexpressed gene	16	18133
A_55_J1965101	Xlr2b	X-linked lymphocyte-regulated 3C	15	22116
A_51_P2000259	Ppm1n	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ -dependent, 1N	15	132941
A_55_J2018697	Laldh	Lactate dehydrogenase, D	15	32813
A_55_J2038625	Fbln7	Fibulin 7	15	93370
A_52_P676819	Buc1	Basonuclin 1	14	12173
A_55_P2027396	Gpr156	G protein coupled receptor 156	14	239645
A_51_P315665	Nid2	Nidogen 2	14	18074
A_55_P1999962	Pdn	Perlecan	14	213938
A_55_P2173947	Zar11	Zygoete ames 1-like	13	616790
A_55_J1996776	Sklf1	Solute carrier family 1 (anion exchanger), member 1	13	51002
A_55_P2000095	LOC674948	Similar to X-linked lymphocyte regulated protein 3A	13	674948
A_55_P1975370	Apoel	Apolipoprotein C-I	12	11812
A_51_P205085	Ogn	Osteoglycin	12	18295
A_51_P142421	Rspo1	R-spondin homolog	11	192199
A_52_P278336	Fbln5	Fibulin 5	11	28376
A_55_P1970924	Gm5366	Tubulin, alpha 1A (scudogenic)	10	381954
A_21_J216961	Mmap	Melanocortin 2 receptor accessory protein	10	77057
A_52_P29743	5033411D12Rik	RIKEN cDNA 5033411D12 gene	10	192136
A_51_J430888	Rnr4	Reticulon 4 receptor	10	63079
A_52_P546512	Pgyr1	Neuropeptide Y receptor Y4	10	19065
A_55_P2013018	Cysr1	Cysteine/serine/threonine receptor 1	10	58861
A_51_P338998	Ptin2	DNA primase, p58 subunit	9	19076
A_21_J116360	Msln	Mesothelin	9	26017
A_51_P117239	Tgfr	c-erbB-induced growth factor	9	14305
A_52_J236494	Mycn	c-Myc myelocytomatosis viral-related oncogene, neuroblastoma derived	9	15109
A_51_P497985	C2	Complement component 2	9	12262
A_51_P225224	Htra1	HuA serine peptidase 1	9	56213
A_52_P202792	Col8a1	Collagen, type VIII, alpha 1	8	12837
A_51_P309920	Itga8	Integrin alpha 8	8	241226
A_52_P454183	Olfm2b	Olfactomedin-like 2B	8	530078
A_52_J249182	Gmr4	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA4	8	14302
A_55_J2010216	TN0006P20Rik	Tescalan-like	8	69391
A_51_P461319	Galm	Glycine amidinotransferase	8	67092
A_55_P2053561	Gm13011	Predicted gene 13011	8	242711
A_51_P207622	Fmod	Fibronectin	8	14264
A_55_P1978681	Tspan8	Tetraspanin 8	8	216350
A_51_P169110	Dpp4	Dipeptidylpeptidase 4	8	15182
A_51_J279709	Cuod1	CuE domain containing 1	8	101092
A_55_J2286176	CU3009012Rik	RIKEN cDNA CU3009012	8	77528
A_55_J2161450	Scpm3b	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3B	8	271047
A_51_P240019	Gyg	Glycogenin	7	27357
A_55_P2020072	LOC100644365	Similar to Des4 protein	7	100644365
A_51_P153923	Fndc1	Fibronectin type III domain containing 1	7	68685
A_52_P82840	Cpsm2	Carboxypeptidase X 2 (M14 family)	5	55387
A_55_J2013991	Tgfr9	Fibroblast growth factor 9	5	14180

Continued

Table 1. *Continued*

Unique ID	Entrez Symbol	Description	Fold Change	Entrez ID
A_52_P413646	Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	4	12161
A_55_P2073754	Adam23	A disintegrin and metallopeptidase domain 23	4	23792
A_55_P2022678	C1qtnf3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3	3	56745
A_55_P2151387	Bmp1	Bone morphogenetic protein 1	3	12159
A_55_P2031636	Igf1	Insulin-like growth factor 1	3	16000
A_52_P516409	Col4a6	Collagen, type IV, $\alpha 6$	3	94216
A_55_P2100573	Col11a1	Collagen, type XI, $\alpha 1$	3	12811
A_51_P3081299	Lox1	Lysyl oxidase-like 1	3	16919
A_55_P2132651	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	3	22402
A_52_P204128	Mmp14	Matrix metallopeptidase 14 (membrane inserted)	3	17387
A_51_P282114	Adam23	A disintegrin and metallopeptidase domain 23	3	23792
A_55_P2098805	Adamts3	ADAMTS like 3	3	269959
A_55_P2118520	Col1a1	collagen, type I, $\alpha 1$	3	12842

Table 2. *Most downregulated genes in Mmp19^{-/-} mice lung fibroblasts*

Unique ID	Entrez Symbol	Description	Fold Change	Entrez ID
A_51_P318781	Pgf	Placental growth factor	8	18654
A_55_P1961099	Atg4c	Autophagy related 4C, cysteine peptidase	8	611330
A_55_P2391908	Fc	Follistatin	8	14312
A_52_P121767	Rbbp1	Retinoblastoma-binding protein 1	8	19616
A_55_P2067707	Mep1a	Megilin 1a	8	17287
A_51_P193666	130002H090K	RIKEN cDNA 130002H090 gene	8	69328
A_51_P300661	Rpl182	Ring finger protein 182	8	328231
A_55_P1975874	Bcl2l15	BCL2 like 15	8	229672
A_51_P438841	Canna2	Canin (cadherin associated protein), $\alpha 2$	8	12386
A_52_P519973	191300N030K	Conserved-rich 2	8	66749
A_55_P2054236	1101100K1908K	Similar to GPR	8	10001988
A_51_P111982	Beau	Brain expressed, associated with Nedd4, 1	8	63115
A_55_P2057050	2610305D13Rik	RIKEN cDNA 2610305D13 gene	9	113122
A_52_P274196	Tspan18	Tetraspanin 18	9	241556
A_52_P331762	Limo1	LIM domain only 1	9	105594
A_55_P1956497	Scpnlf2	Scrin (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 2	10	18816
A_55_P2010036	Igap1	Integrin $\alpha 1$	10	16161
A_55_P2081105	A1607873	Expressed sequence A1607873	10	226691
A_56_P119034	Plaf1g	Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	10	22726
A_66_P125777	Slc43a2	Solute carrier family 43, member 2	10	225213
A_55_P2091570	Car5	Carbonic anhydrase 5	10	12352
A_55_P2017677	Cap2	CAP, cdc42hsc cyclase associated protein, 2	11	67252
A_55_P2069891	1700007G05Rik	RIKEN cDNA 1700007G05 gene	11	114673
A_55_P1952920	A1884703	Expressed sequence A1884703	12	273373
A_55_P1961896	Gm3014	Predicted gene 3014	14	100010872
A_51_P501897	Plix2	Paired like homeodomain transcription factor 2	14	18741
A_51_P2790138	Pnra2a	Neurokinin 1/interleukin-1 receptor, $\gamma 1$, constitutive 1a	14	19017
A_51_P311051	Gilpr1	GIL pathogenesis-related 1	14	73690
A_55_P2137023	Glad2	Glutamate receptor, ionotropic, $\delta 2$	15	14804
A_55_P2125557	Irx2	Irquanin related homeobox 2	17	16372
A_55_P1916278	Ptk6b	Protein kinase C, β	17	18751
A_55_P1988368	Upp1	Uridine phosphorylase 1	17	22271
A_55_P2132512	Ngef	Neurotact granule nucleotide exchange factor	18	33972
A_55_P2086153	Oas1	2'-5' Oligoadenylate synthetase-like 1	18	231655
A_55_P2017976	Mir17 hg	Mir17 host gene 1	18	75957
A_55_P2105944	Olf224	Olfactory receptor 224	20	258198
A_51_P317695	Trpc1	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3	21	22065
A_55_P2035946	Penk	Proenkephalin	21	18619
A_51_P269166	Mmp19	Matrix metallopeptidase 19	21	38223
A_55_P20249	Ptk6b	Protein kinase C, β	22	18751
A_55_P1974432	Gm5067	Predicted gene 5067	23	272714
A_55_P2057081	2610305D13Rik	RIKEN cDNA 2610305D13 gene	23	112122
A_55_P2099366	Slac2	SH3 and cysteine-rich domain 2	29	217131
A_55_P2163128	0610042G04Rik	RIKEN cDNA 0610042G04 gene	30	68380
A_55_P2037308	Six2	Sine oculis related homeobox 2	35	26472
A_52_P619218	Pf125	Protein family 2, subfamily c, member 5	72	107819