



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Evaluación de la respuesta fibrosante en el pulmón del ratón modificado genéticamente doble deficiente de las enzimas MMP8 y MMP13.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

José Fabián Vergara Ovalle

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Sandra Cabrera Benítez
Facultad de Ciencias

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Annie Pardo Semo
Facultad de Ciencias

Dr. Fernando López Casillas
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Agosto, 2016



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.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
RESUMEN.....	4
ANTECEDENTES.....	5
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS.....	35
MÉTODOS.....	36
RESULTADOS.....	45
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIONES.....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	80

❖ ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Histología del pulmón normal y fibrótico.....	7
Figura 2. La unidad estructural-funcional del pulmón es el alveólo.....	12
Figura 3. Niveles estructurales de la colágena.....	13
Figura 4. Dominios estructurales de las MMPs.....	16
Figura 5. Mecanismo catalítico de las MMPs.....	17
Figura 6. Mecanismo de activación de las MMPs.....	21
Figura 7. Clasificación de las MMPs con base en sus dominios estructurales.....	24
Figura 8. Posible mecanismo de las diferentes MMPs.....	32
Figura 9. Localización de los genes que codifican para la Mmp8 y Mmp13	33
Figura 10. Mapa de construcción para interrumpir la expresión de MMP8 y MMP13.....	34
Figura 11. Curso temporal del modelo experimental de fibrosis inducida por bleomicina.....	40
Figura 12. Análisis del genotipo para el gen Mmp8.....	45
Figura 13. Análisis del genotipo para el gen Mmp13.....	47
Figura 14. Niveles de expresión génica ($2^{-\Delta ct}$) de los genes Mmp8 y Mmp13.....	50
Figura 15. Histología de pulmón WT y MMP8-MMP13 dKO	51
Figura 16. Histología de pulmón WT y dKO, 7 días post instilación de bleomicina.....	52
Figura 17. Histología de pulmón en el período de 7 días, etapa inflamatoria.....	52
Figura 18. Histología de pulmón en el período de 28 días, etapa fibrosante.....	53
Figura 19. Histología de pulmón WT y dKO , etapa fibrosante (Masson).....	54
Figura 20. Histología de pulmón WT y dKO en etapa de resolución de la FP.....	55
Figura 21. Curso temporal del modelo de fibrosis pulmonar.....	56
Figura 22. Score de fibrosis.....	57
Figura 23. Análisis de μg de hidroxiprolina en condiciones basales, etapa fibrosante y resolución.....	58
Figura 24. Análisis de la calidad de ARN.....	59
Figura 25. Niveles de expresión génica ($2^{-\Delta ct}$) en pulmón de ratones WT vs dKO (Basal).....	61
Figura 26. Niveles de expresión génica ($2^{-\Delta ct}$) en pulmón de ratones WT VS dKO (fibrosantes).....	62

Figura 27. Detección de la proteína MColA por Western Blot y QPCR.....	63
Figura 28. Inmunolocalización de MColA en el tejido pulmonar.....	64
Figura 29. Inmunolocalización de MMP8 en el tejido pulmonar.....	65
Figura 30. Inmunolocalización de MMP13 en el tejido pulmonar.....	66
Figura 31. Inmunolocalización de TIMP1 en el tejido pulmonar	67
Figura 32. Inmunolocalización de MMP2 en el tejido pulmonar.....	69
Figura 33. Inmunolocalización de MMP9 en el tejido pulmonar.....	70

Tablas.

Tabla 1. Secuencia del gen Mmp8.....	46
Tabla 2. Inmunolocalización de MMPs y TIMPs.....	70

La remodelación de la matriz extracelular, incluyendo la colagenólisis, es fundamental en el desarrollo del pulmón y su homeostasis, y su alteración contribuye a numerosas patologías tales como la fibrosis pulmonar. La colagenólisis está mediada principalmente por metaloproteinasas de matriz (MMPs), entre ellas MMP1, MMP13 y MMP8. Recientemente se ha generado un ratón mutante doble deficiente, que contiene deleciones de pérdida de función en los genes *Mmp8* y *Mmp13*, el cual hemos usado como un modelo de degradación deficiente, para evaluar el papel de estas colagenasas en la remodelación de la matriz extracelular después de la lesión pulmonar. Los ratones doble deficientes *Mmp8-Mmp13* fueron tratados con bleomicina, y se analizó la respuesta inflamatoria y fibrosante a los 7, 28 y 42 días. El contenido de colágena en el pulmón se evaluó midiendo la hidroxiprolina. Después de inducir daño pulmonar con la bleomicina, observamos a los 28 días que los ratones doble deficientes *Mmp8-Mmp13* mostraron una fibrosis más extensa, densa y severa, caracterizada por un aumento significativo en el depósito de colágena en el pulmón. Se ha sugerido que las enzimas MMP2 y MMP9 también pueden tener actividad colagenolítica en condiciones fisiológicas. Encontramos que el nivel de ambas enzimas fue significativamente mayor, tanto en las muestras de lavado bronquio-alveolar, como en las de pulmón provenientes de los ratones doble deficientes *Mmp8-Mmp13*, a los 28 días del tratamiento con bleomicina. Además, se encontró un aumento significativo en el nivel de expresión de MMP14 en los pulmones de ratones doble deficientes *Mmp8-Mmp13*, también a los 28 días post-tratamiento. Además, se observó un retraso en la resolución de la fibrosis en los pulmones de ratones doble deficientes *Mmp8-Mmp13*, lo que indica un papel muy específico para estas enzimas durante la remodelación de la matriz extracelular después de la lesión y la fibrosis, y que su función no puede ser compensada por otros miembros de la familia MMP. Nuestros resultados indican que en la ausencia de las enzimas MMP8 y MMP13, aumenta la severidad de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Proponemos que los ratones doble knockout de *Mmp8* y *Mmp13* representan un nuevo modelo in vivo para dilucidar la relevancia funcional de ambas colagenasas en trastornos fibrosantes y en el estudio de la resolución de la fibrosis.

Fibrosis Pulmonar Idiopática: Una enfermedad incurable y letal.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la más agresiva de las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID). Es de etiología desconocida, crónica, irreversible y letal, se presenta en adultos de más de 50 años y el promedio de supervivencia de los pacientes es de 3 a 5 años después de diagnosticada la enfermedad. Actualmente el trasplante pulmonar es el único tratamiento efectivo para alargar la vida y mejorar el estado funcional pulmonar de los pacientes que padecen esta enfermedad. Sin embargo, los pacientes trasplantados tienen una expectativa de vida limitada. Estudios recientes han sugerido que la FPI es una enfermedad desarrollada por daño epitelial crónico y por la activación progresiva de procesos de cicatrización y fibrosis. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas contra la FPI tendrán que estar dirigidas hacia la prevención del daño epitelial, así como el uso de agentes antifibróticos que promuevan la resolución de fibrosis, en sustitución de corticosteroides e inmunosupresores, cuya efectividad demostrada ha sido baja o casi nula (Selman M, et al, 2002).

La fibrosis pulmonar es una enfermedad caracterizada por daño epitelial, acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular (principalmente de colágenas fibrilares) y por la presencia de focos de fibroblastos y miofibroblastos en el parénquima pulmonar. En condiciones fisiológicas, el alvéolo (la unidad funcional del pulmón) está formado por epitelio simple (neumocitos tipo I y neumocitos tipo II), estrechamente asociado al endotelio, de hecho, en algunas regiones la membrana basal del epitelio está fusionada con el endotelio, lo cual favorece el intercambio gaseoso. Por otro lado el intersticio, compuesto por tejido conjuntivo, mantiene unidos al alvéolo con la red de capilares que lo rodean, sin embargo, cuando ocurre daño al epitelio, el intersticio se engrosa debido a la migración y proliferación de fibroblastos hacia las zonas dañadas, y la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, los cuales se organizan en pequeños grupos denominados “focos de miofibroblastos”. Los miofibroblastos son las células responsables de la síntesis exagerada de moléculas de la matriz extracelular, esto conduce a la acumulación excesiva de colágenas fibrilares que alteran la arquitectura y función del

parénquima pulmonar (Pardo A, et al, 2002). Estas alteraciones en la histología del pulmón conducen a la insuficiencia respiratoria (Fig. 1).

La regulación controlada entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular es crucial para mantener la homeostasis del tejido pulmonar. En este contexto, la fibrosis pulmonar puede ser conceptualizada como la pérdida de la regulación en el metabolismo de la matriz extracelular. Las principales alteraciones en el metabolismo de la matriz extracelular durante la fibrosis pulmonar son: depósito excesivo de colágenas fibrilares en los espacios intersticial y alveolar, así como la ruptura y desintegración de las membranas basales. Se ha estimado que en etapas avanzadas de la enfermedad, el pulmón fibrótico puede contener de 2 a 3 veces más moléculas colágena tipo I y III, por encima del nivel fisiológico. Por otro lado, el rompimiento de la membrana basal es un evento muy importante en esta patología y ha sido postulado que la migración de fibroblastos y miofibroblastos hacia los espacios alveolares ocurre a través de la membrana basal desintegrada (Selman M, et al, 2002).

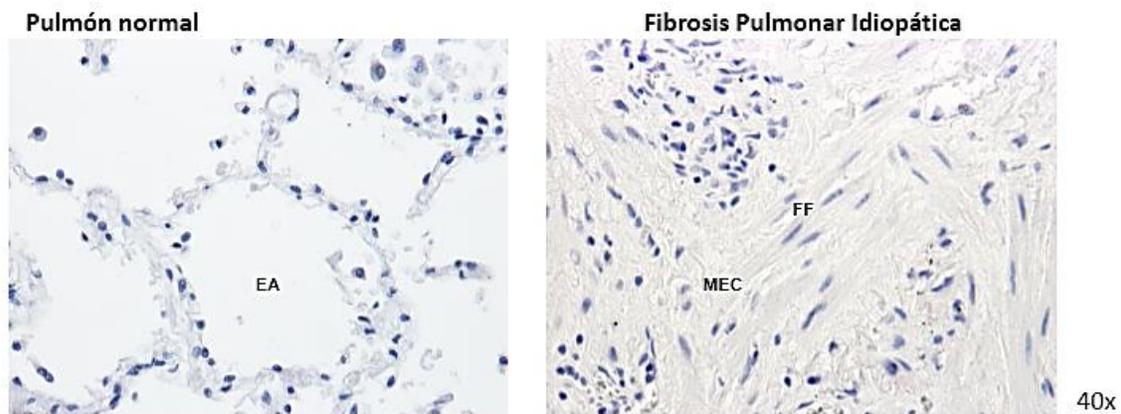


Figura 1. Histología del pulmón normal y fibrótico. Izquierda: histología normal del pulmón, se observan los alveolos formados por células epiteliales, y en la luz, el espacio alveolar (EA), ocupado por aire. Derecha: histología de un pulmón fibrótico, se observa la desorganización total del alvéolo, foco de fibroblastos (FF) y el depósito exagerado de matriz extracelular (MEC), lo cual interrumpe por completo el intercambio gaseoso. Tinción con hematoxilina acuosa.

La remodelación de la matriz extracelular está regulada principalmente por la actividad de una familia de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz o MMPs (por sus siglas en inglés; *Matrix Metalloproteinases*). Actualmente se ha demostrado que las MMPs además tienen actividad sobre una gran variedad de sustratos que no son componentes de la matriz

extracelular, incluyendo otras proteasas, inhibidores de proteasas, factores de coagulación, moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento, proteínas de unión a factores de crecimiento, moléculas de adhesión célula-célula, hormonas, y receptores transmembranales. Debido a que pueden procesar todos los componentes de la matriz extracelular, además de tener efecto sobre otras moléculas, se ha descrito que las MMPs pueden participar en diferentes procesos biológicos como migración, proliferación, diferenciación y apoptosis (Fanjul-Fernández M, et al, 2010).

Ha sido ampliamente aceptado que tanto las MMPs como los TIMPs (por sus siglas en inglés; *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) juegan un papel importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, sin embargo, el mecanismo exacto no ha sido caracterizado (Selman M, et al, 2000). Diversos estudios han mostrado que existen alteraciones importantes en la expresión y localización de las MMPs y los TIMPs en la fibrosis pulmonar, tanto en humanos, como en modelos experimentales (bleomicina, sílice, paraquat e hiperoxia). Estudios recientes donde se ha analizado la expresión génica global en FPI, utilizando microarreglos, han revelado que diferentes genes que codifican para MMPs están significativamente aumentados en los pulmones fibróticos. Entre ellos están: la matrilisina (MMP7), la colagenasa 1 (MMP1), las gelatinasas (MMP2 y MMP9) (Selman M, et al, 2006). Por otro lado, en el modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, también se analizó el perfil de expresión génica, en distintos períodos de tiempo, y se observó que la expresión de MMP8, MMP12, MMP13, MMP14 y MMP19, aumenta durante la etapa fibrosante (Cabrera S, et al, 2013). Estos hallazgos resultan paradójicos, porque hipótesis iniciales proponían que durante la fibrosis pulmonar, la expresión de MMPs, por ejemplo gelatinasas y colagenasas podría estar disminuida, y esto estaba asociado con una tasa baja de degradación de colágenas fibrilares, lo cual conducía a su acumulación. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que es crucial considerar la expresión tejido-específica, por ejemplo, en el pulmón de pacientes con FPI se ha observado que la colagenasa 1 o MMP1, está altamente expresada, esencialmente en el epitelio mientras que está completamente ausente en el intersticio, sitio donde se depositan y acumulan las colágenas fibrilares (Selman M, et al, 2006).

La visión de las MMPs como enzimas que sólo participan en la degradación de componentes de la matriz extracelular ha cambiado y ahora sabemos que intervienen en distintos procesos celulares. En la patogénesis de la FPI, las MMPs pueden tener un papel pro-inflamatorio o anti-inflamatorio, por ejemplo, pueden facilitar el reclutamiento de leucocitos durante la inflamación, así como contribuir a la resolución de la inflamación, mediante el procesamiento de mediadores inflamatorios y receptores (Werb Z, et al, 2007). Un ejemplo de esto último es el procesamiento de la proteína quimiotáctica de monocitos 3 (MCP3) por MMP2 (Weiss SJ, et al, 2013), o la degradación de la interleucina 12a (IL-12 α) de igual manera por MMP2 que inhibe la activación de células Th1, encargadas de la activación de macrófagos, así como de las respuestas fagocíticas. Como un ejemplo de activación de la respuesta inflamatoria, la MMP8 puede activar mediante un corte proteolítico a la interleucina 8 (IL-8), la cual es necesaria para el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón (García-Prieto E, et al, 2010).

En este proyecto de investigación, se evaluó específicamente el papel de las enzimas MMP8 y MMP13 en el desarrollo de fibrosis pulmonar, usando un modelo animal experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, desarrollado en un ratón modificado genéticamente, doble deficiente de *Mmp8* y *Mmp13*. Este ratón doble deficiente representa un modelo de alteración en la colagenólisis, debido a que el ratón carece de la enzima MMP1 (expresada en humano), y las dos colagenasas principales en esta especie, la MMP8 y la MMP13. Este modelo animal también permitió evaluar el papel de estas colagenasas en la resolución de la fibrosis pulmonar, y determinar si otras MMPs compensan la ausencia de las colagenasas en el pulmón.

Como se mencionó previamente, la FPI es una enfermedad crónica, irreversible y letal. Hasta ahora, esta enfermedad es un reto para la ciencia básica, dado que su etiología no se conoce con precisión y además es incurable. Es importante puntualizar, que existen muy pocos trabajos enfocados en estudiar la resolución de la fibrosis pulmonar. En otros órganos, ha sido demostrado que la fibrosis se puede revertir, como en el caso de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis viral crónica. La regresión de fibrosis también se ha demostrado en modelos animales de fibrosis hepática y en el caso de pulmón, en modelos experimentales de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se ha reportado que

a partir de los 28 días post-tratamiento inicia la etapa de reversión; sin embargo, los mecanismos de resolución no han sido definidos y no se ha descrito si ocurre la resolución total, ni el período de tiempo en los modelos experimentales. En esta tesis, se evaluó un período mayor (42 días), para evaluar los cambios histológicos y bioquímicos que ocurren durante la reversión de la fibrosis en presencia y ausencia de las colagenasas.

I. MATRIZ EXTRACELULAR.

La Matriz Extracelular (MEC) es una red supramolecular compuesta por proteínas fibrilares, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, que provee un soporte estructural, compartimentaliza los tejidos y regula la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular. La MEC se organiza en dos estructuras especializadas, la membrana basal, y la matriz intersticial. Por lo anterior la MEC también participa en procesos tisulares como cicatrización, organogénesis, embriogénesis, metástasis y angiogénesis. La membrana basal está compuesta por colágena tipo IV, laminina, entactina y proteoglicanos, mientras que el tejido conectivo intersticial consiste de colágenas fibrilares (tipo I, II y III), fibras elásticas y proteoglicanos (Pardo, et al 2000).

I.I La MEC del pulmón.

En el pulmón la lámina basal se encuentra por debajo del epitelio alveolar y bronquiolar, así como rodeando el endotelio vascular. Por debajo de toda esta membrana basal se encuentra el intersticio y en conjunto conforman la MEC del pulmón. Esta MEC está especializada en la facilitación de la ventilación y la difusión de gases. En la zona proximal de las vías aéreas encontramos cartílago, una forma especializada de MEC que evita el colapso de las vías aéreas. En cambio, en la parte distal de las vías aéreas, donde se realiza el intercambio gaseoso, existe una membrana extremadamente delgada que separa la luz alveolar de los capilares. Esta barrera se encuentra en zonas donde el endotelio capilar y el epitelio alveolar se fusionan. Por lo tanto, no existe un intersticio en esta zona y se minimiza el grosor de la membrana para el intercambio gaseoso. La MEC juega un papel primordial en el desarrollo de las vías aéreas. Se ha observado que la fibronectina, los glucosaminoglicanos, la laminina, la colágena tipo IV, las integrinas y las MMPs están involucradas en las vías de la morfogénesis pulmonar.

Se conocen al menos doce tipos de células epiteliales en la superficie pulmonar, las cuales cumplen diversas funciones como la secreción de moco, iones, proteínas, lípidos y factores de inflamación, además de la formación de una barrera entre la luz de la vía aérea y el parénquima pulmonar, limpieza de detritus inhalado y la participación en la cicatrización (Farver, et al, 2009). Existen dos tipos principales de células epiteliales que constituyen al epitelio alveolar, los neumocitos tipo I y los neumocitos tipo II. Los neumocitos tipo I cubren el 93% de la superficie alveolar, presentan un citoplasma alargado, de mínimo grosor para facilitar el intercambio gaseoso. Los neumocitos tipo II son cuboidales, con alta actividad metabólica y secretoria. Entre sus principales funciones destacan la síntesis, secreción y reabsorción del surfactante, el cual es una mezcla de fosfolípidos y proteínas que disminuye la tensión superficial alveolar en la interfase líquido-gas, y evita que el alveolo colapse. Otras funciones de las células epiteliales alveolares o neumocitos tipo II, son el metabolismo de xenobióticos y ser progenitoras de los neumocitos tipo I durante el desarrollo y la cicatrización (ver **Fig. 2**) (Dunsmore S. et al, 1996).

La membrana basal en el pulmón está constituida por colágena tipo IV, condroitín sulfato, heparán sulfato, entactina, laminina, fibronectina y por las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 6$. Con respecto al intersticio pulmonar, este es determinante en la función del pulmón, pues mantiene su integridad durante la ventilación. La parte celular del intersticio pulmonar consiste de células intersticiales (fibroblastos, miofibroblastos y pericitos) y células inflamatorias (fagocitos mononucleares, linfocitos y mastocitos, **Fig. 2**). De todos estos tipos celulares, los fibroblastos son los más numerosos. Por otro lado, los componentes no celulares del intersticio son fibras de colágena, elastina y proteoglicanos. Los fibroblastos son capaces de sintetizar la mayoría de los componentes de la MEC del intersticio como colágena tipo I y III, elastinas, fibronectina, heparán sulfato, condroitín sulfato, dermatán sulfato y ácido hialurónico.

Aunque más adelante se revisará a mayor detalle, es importante señalar que durante la fibrosis pulmonar existe un aumento en la síntesis y acumulación de los componentes de la MEC, particularmente de colágena tipo I y III en el espacio intersticial, por lo que se engrosa el intersticio pulmonar y se afecta considerablemente el intercambio gaseoso, lo

que conduce a la insuficiencia respiratoria en los individuos que padecen FPI (Pardo A, et al, 2000).

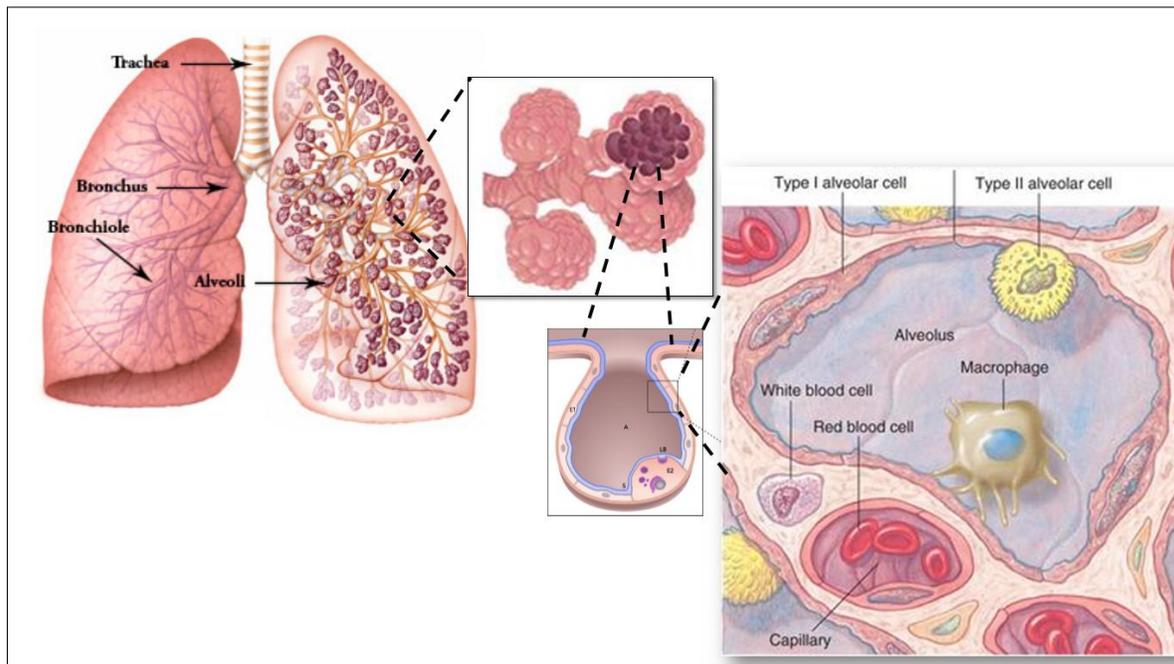


Figura 2. La unidad estructural-funcional del pulmón es el alveolo. De izquierda a derecha se muestra un lóbulo pulmonar, el árbol bronquiolar, los sacos alveolares y finalmente un alveolo. En el inserto de la derecha se muestra el epitelio (neumocitos tipo I y tipo II), el endotelio (capilares), macrófagos alveolares, fibroblastos y el espacio intersticial (MEC).

I.II La colágena es el principal componente de la MEC.

Las colágenas son proteínas que consisten de tres cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas α , cada una de las cuales, tiene la forma de una hélice levógira, con 3.3 residuos de aminoácidos por vuelta. Las tres cadenas α se superponen una encima de la otra de manera dextrógira (**Fig. 3**). Estas cadenas consisten de repeticiones del motivo de tres aminoácidos Gly-X-Y, donde el 30% de las posiciones X y Y son prolina. Además, la prolina en la posición Y, sufre una modificación postraduccional por hidroxilación que genera a la hidroxiprolina. Esta modificación postraduccional le da estabilidad a la molécula de colágena ya que permite el establecimiento de puentes de hidrógeno. La hidroxilación de la prolina es una modificación que virtualmente ocurre solo en la colágena, por lo tanto es utilizada como un biomarcador para evaluar el contenido de colágena en los tejidos o en el medio de cultivo. La lisina de la colágena también es hidroxilada formando hidroxilisina.

Este aminoácido forma enlaces covalentes entre dos moléculas de pro-colágena (lo que se conoce como entrecruzamiento) algo de suma importancia para la formación de fibras (Alberts B, et al, 2009; Dunsmore S, et al, 1996) (**Fig. 3**).

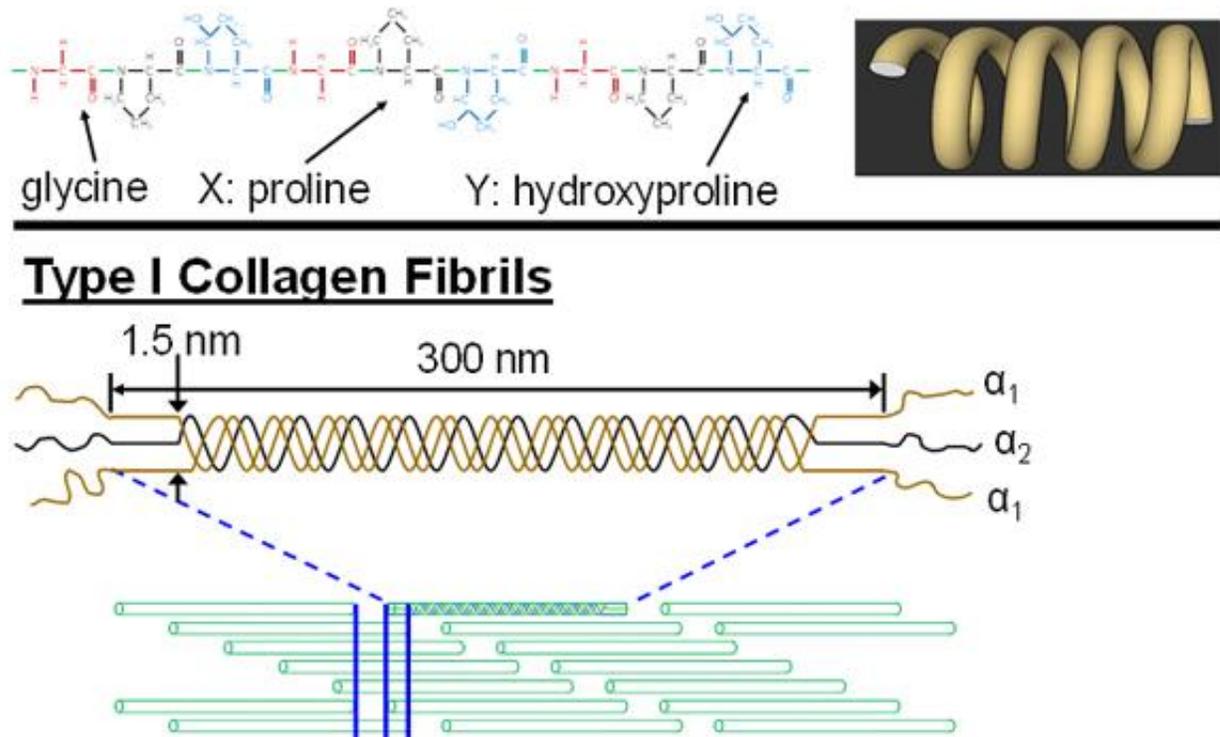


Figura 3. Niveles estructurales de la colágena. Estructura primaria: motivo Gly-X-Y. Estructura secundaria: cadena α o hélice de colágena. Estructura cuaternaria: entrelazamiento de las 3 cadenas α en la pro-colágena establecidos por puentes de hidrógeno entre las hidroxiprolinas, se muestran los telopéptidos o pro-dominios. Las líneas azules punteadas representan a la molécula madura de colágena sin los telopéptidos y la formación de fibrillas con el desplazamiento característico $\frac{1}{4} - \frac{3}{4}$ (1.5 nm).

Las colágenas pueden ser divididas en dos clases, fibrilares y no fibrilares. Las colágenas fibrilares (Tipos I, II, III, VI y XI) son los principales componentes del tejido conectivo. Estas colágenas son sintetizadas como un precursor o procolágena. Es durante esta etapa que ocurren las diversas modificaciones postraduccionales necesarias para formar la estructura helicoidal, es decir, 4-prolil-hidroxilación, hidroxilación de lisina y glicosilación de hidroxilisina. Una vez liberadas al espacio extracelular se eliminan los prodominios o telopéptidos por las peptidasas de colágena (**Fig. 3**). Las colágenas no fibrilares se dividen en tres grupos: colágenas de la membrana basal (Tipo IV y VII), colágenas de cadena

corta (Tipo VIII y X) y colágenas asociadas a fibras con triple hélices interrumpidas o FACIT (IX, XII y XIV) (Dunsmore S, et al, 1996).

II. METALOPROTEASAS DE MATRIZ (MMPs).

En 1962, Gross y Lapiere descubrieron una proteína con actividad colagenolítica en el tejido de colas de renacuajos durante la etapa de metamorfosis. Desde entonces se han descrito 25 MMPs en vertebrados y 24 para el caso del humano denominadas de la 1 a 3, de 7 a la 17, de 19 a 21 y de 23 a 28, por razones históricas, incluyendo las dos MMP23 idénticas, codificadas por los dos genes separados MMP23A y MMP23B (Page McCaw A, et al, 2007; Löffek S, et al, 2011).

La familia de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz (MMPs) pertenece al clan de las Metzincinas, las cuales obtienen su nombre debido a que requieren un átomo de Zinc para realizar su actividad catalítica y poseen un residuo de Metionina conservado alrededor del sitio activo para la estabilización del ion con la proteína (Weiss SJ, et al, 2013). Las MMPs son las principales proteasas responsables de la degradación de los componentes de la matriz extracelular, y actualmente se ha demostrado que además tienen actividad sobre una gran variedad de sustratos que no son componentes de la MEC, ya sea por el corte directo proteolítico o liberándolas de la MEC para su circulación. Algunas de las moléculas que sufren regulación por las MMPs son: otras proteasas, inhibidores de proteasas, factores de coagulación, moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento, proteínas de unión a factores de crecimiento, moléculas de adhesión célula-célula y célula-MEC, hormonas, y receptores transmembranales (Greenle KJ, Kheradmand F., 2007; Gomis Rütth X, et al. 2010). Si este potencial de proteólisis no es regulado adecuadamente, pueden generarse diversas patologías como inflamación, artritis, úlceras, periodontitis, tumorigénesis, neovascularización tumoral, fibrosis o enfisema (Weiss A, et al, 2013; Gomis Rütth X, et al, 2010).

II.I Dominios estructurales de las MMPs.

Las MMPs comparten varias características funcionales incluyendo:

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

Los miembros de la familia de las MMPs tienen una serie de dominios conservados característicos:

- El **péptido señal (PS) o pre-dominio** que dirige a la proteína a la secreción extracelular (**Fig. 4**).
- El **pro-péptido o pro-dominio (80aa aprox.)** es responsable de la latencia de las MMPs. Un residuo de cisteína altamente conservado en el propéptido (PRCGVPD) de todas las MMPs, es responsable de estabilizar la estructura inactiva de la proenzima. El grupo tiol de este residuo de cisteína forma un enlace coordinado con el átomo de zinc que se encuentra en el dominio catalítico manteniendo de esta forma la latencia de la enzima. La activación de cualquier pro-MMP requiere el rompimiento de este enlace cisteína- Zn^{2+} , a este mecanismo se le conoce coloquialmente como *switch de cisteína* (**Fig. 4**).
- El **dominio catalítico (170 aa)** es responsable de la actividad proteolítica y presenta una secuencia conservada por todas las metzincinas (-HEXXHXXGXXH-), que posee las tres histidinas a las que se une el ion Zn^{2+} , así como el glutamato necesario para la actividad catalítica. También existen de 2 a 3 iones de Ca^{2+} y un ión adicional de Zn^{2+} estructural. Además presenta un residuo de Metionina 8 aa después del sitio de unión a Zn^{2+} para estabilizarlo (**Fig. 4**).
- El **dominio tipo hemopexina** (200 aa aprox.) se encuentra en el extremo carboxilo-terminal, tiene de 3 a 4 secuencias repetidas similares a la proteína hemopexina, y se conecta al dominio catalítico mediante una región de longitud variable, rica en prolina, denominada “bisagra”. El dominio tipo hemopexina y la región de bisagra participan en el reconocimiento de la enzima por su sustrato y en la interacción de la enzima con sus inhibidores. Todas las MMPs excepto la MMP-7

y la MMP-26 contienen este dominio (Mott J. y Werb Z., et al, 2004; Somerville R. et al., 2003; Visse R. et al., 2003; Gomis-Rüth X, et al, 2010) (**Fig. 4**).

- Existen **dominios específicos** de algunas MMPs, por ejemplo el dominio de fibronectina presente en las gelatinasas, el cual ayuda a la especificidad del sustrato; el dominio transmembranal tipo I y II, el dominio citoplásmico o el dominio de anclaje a Glicosilfosfatidilinositol (GPI) presentes en las Metaloproteasas de Matriz Transmembranales (MT-MMPs). (**Fig. 4**).

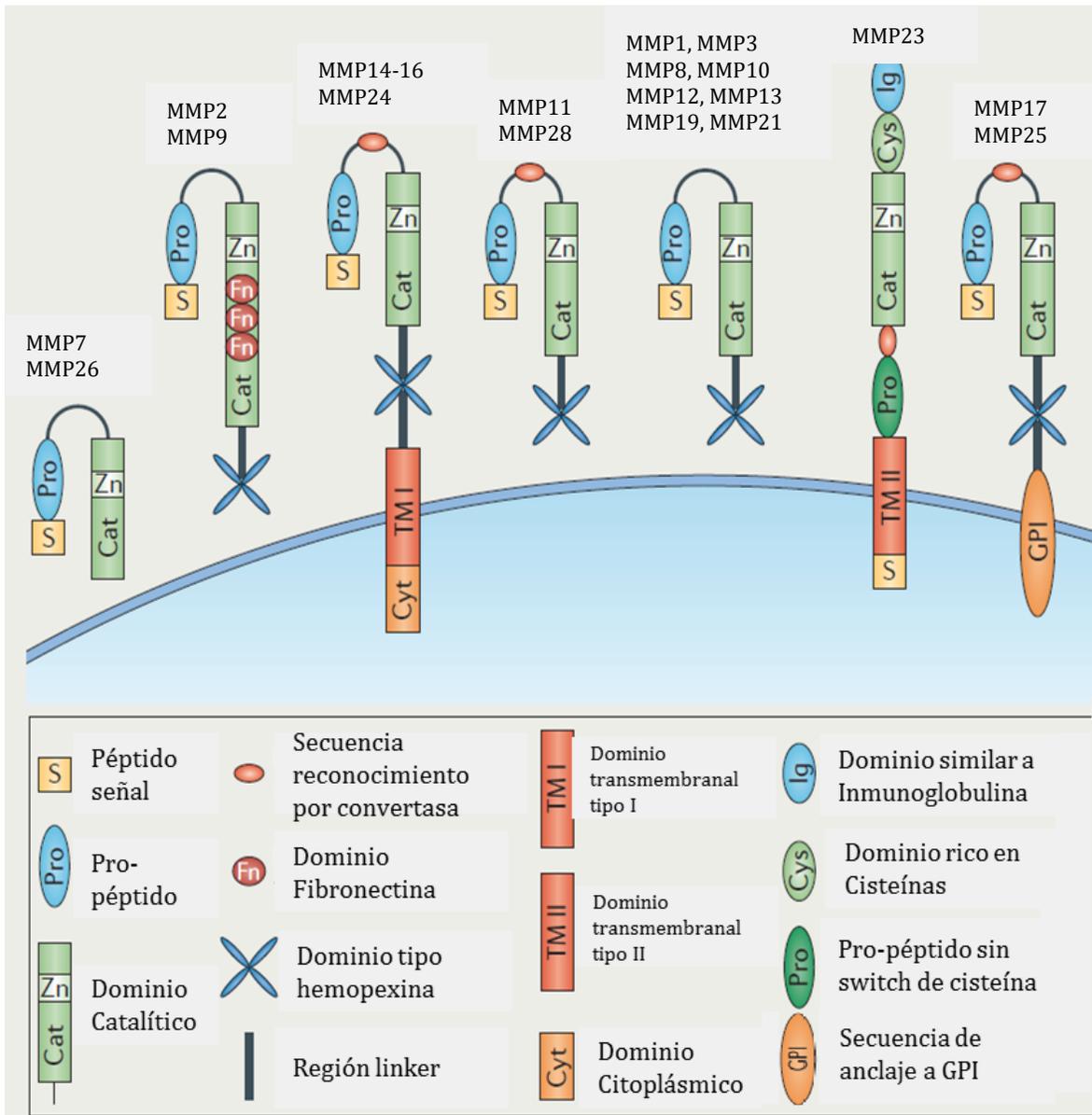


Figura 4. Dominios estructurales de las MMPs (modificado de Weiss, 2013).

II.II Mecanismo catalítico de las MMPs.

El mecanismo de acción de las MMPs se realiza mediante un ataque nucleofílico llevado a cabo por un solvente polarizado por el glutamato ácido/base de la región conservada del sitio activo y el ión Zn^{2+} . Para que este ocurra se debe unir un enlace peptídico escindible a la enzima y formar el complejo de Michaelis. El grupo carbonilo escindible se coordina al Zn^{2+} , el cual se mantiene en su sitio gracias a la unión con los residuos de Histidina de la región de unión a Zn^{2+} (-HEXXHXXGXXH-). Después una molécula de agua se une al glutamato que actúa primero como base y después como un ácido durante la catálisis, liberando un protón capturado del solvente, hacia el nitrógeno de la cadena escindible, transformándolo en un amonio secundario. En el siguiente paso se transfiere un protón del grupo carbonilo escindible hacia el amonio secundario, ya sea directamente o mediante el glutamato, lo que genera los dos productos de la reacción: el carboxilato y α -amónio. La liberación de los dos productos es el paso limitante de la reacción. Para que ocurra, el C-terminal recién formado debe unirse al ion Zn^{2+} y el N-terminal unirse al glutamato. Una molécula de agua se une al Zn^{2+} , liberando al C-terminal y la repulsión entre el Zn^{2+} y el N-terminal provoca su liberación del glutamato (Gomis R  th, et al, 2010) (**Fig. 5**).

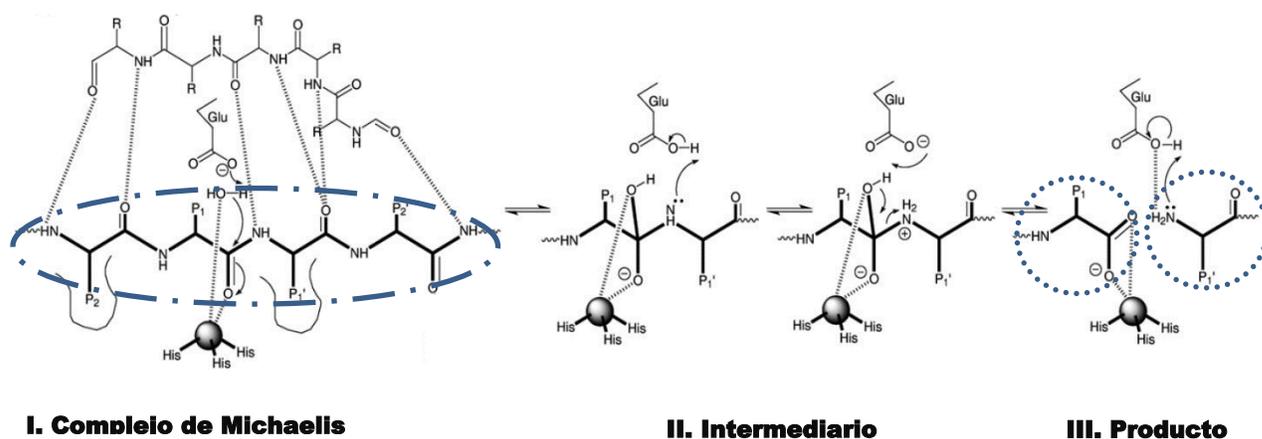


Figura 5. Mecanismo catalítico de las MMPs (modificado de Gomis R  th 2010). Se observa el ataque nucleofílico realizado por el glutamato y el ion Zn^{2+} catalítico. En   rculos punteados se muestran los productos finales o péptidos.

III. NIVELES DE REGULACIÓN DE LAS MMPS.

Como hemos visto, la gran diversidad de sustratos que pueden ser sujetos a activación o degradación por el procesamiento de las MMPs requiere de una regulación exquisita de las mismas. Fallas en esta regulación pueden fácilmente convertirse en destructivas y desencadenar problemas en la homeostasis tisular. Para lograr esta regulación, las MMPs son controladas en cuatro niveles distintos:

- 1) Expresión génica (transcripcional y post-transcripcional).
- 2) Activación del zimógeno.
- 3) Inhibición mediante inhibidores específicos.

III.I Expresión génica (transcripcional y post-transcripcional).

El control de las MMPs y TIMPs *in vivo* ocurre en gran medida a nivel de transcripción, mediante una gran variedad de factores de crecimiento, citosinas y quimiocinas. Varios tipos celulares muestran activación o represión de la transcripción de MMPs dependiente de señales. Estas señales incluyen las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y vías dependientes de SMAD. Un sitio de unión AP1 cerca del promotor de MMP1 fue el primer elemento cis que se describió como implicado en la expresión de MMPs. Desde entonces se han caracterizado diversos elementos cis, entre ellos: PEA3, SP1, Lef-1, NF- $\kappa\beta$, RARE (Clark I, et al, 2008).

Así podemos clasificar a las MMPs, a partir de sus promotores en tres grupos:

- a. Promotores con cajas TATA y sitios de unión AP1 cercanos (70 pb \pm). Aquí se incluyen *Mmp1*, 3, 7, 9, 10, 12, 13, 19, 20 y 26.
- b. Promotores con caja TATA y sin sitio de unión AP1. Incluye a la *Mmp8*, 11, 15, 21 y 22.
- c. Sin caja TATA y sin sitio AP1, encontramos a *MMP2*, 14, 16, 17, 23, 24 y 25.

Esta clasificación resulta útil, pues usualmente la expresión de las MMPs pertenecientes al mismo grupo de promotores, puede aumentar o disminuir su nivel de expresión en respuesta al mismo estímulo en diferentes tipos celulares. Es importante señalar que aun siendo los sitios cis compartidos por diversos promotores de MMPs, puede existir cierto

grado de especificidad al ocurrir diferencias en el número de elementos, su distribución y combinación en cada promotor. Es importante notar que además del sitio AP1, es muy común encontrar un sitio de unión AP3 en varios promotores de MMPs, funcionando estos dos elementos cooperativamente y dado que muy diversos factores ETS pueden unirse a los sitios AP3, esta combinación y cooperatividad pueden aumentar su especificidad (Yan C, et al, 2007).

También existen promotores de MMPs que contienen cajas GC, a las que pueden unirse los factores SP1 y SP3. Los promotores que no poseen cajas TATA ni sitios de unión AP1 suelen expresarse constitutivamente, como el caso de *Mmp2* y *Mmp14*, aunque su expresión también puede verse modificada tras diversos estímulos. Es interesante notar que si se muta el sitio de unión a SP1 en el promotor de *Mmp14* la expresión de este gen disminuye en 90% (Clark I, et al, 2007).

- Acetilación y metilación.

La acetilación es un mecanismo postraduccional de regulación de la transcripción. De manera resumida, la acetilación debilita la interacción DNA:histona, lo que permite el acceso de factores de transcripción al promotor del gen y por tanto, generalmente se asocia con la activación de la expresión. Sin embargo, en el caso de las MMPs la acetilación puede tanto activar (ej *Mmp1*, *Mmp9*), como inhibir (ej. *Mmp8*, 10, y 13) su transcripción (Yan C y Boyd D, 2007). En organismos eucariontes la metilación del DNA se restringe a las bases de citosina, llevada a cabo por las DNA metiltransferasas, las cuales metilan citosinas en dinucleótidos CpG. La metilación suele asociarse con un estado represivo de cromatina y la inhibición de la expresión génica (Klose RJ, et al, 2006). Un ejemplo de esto último ocurre en las células de linfoma, en las que se ha observado una correlación negativa entre la metilación del promotor de *Mmp9* y su expresión. De igual manera, en células de cáncer de colon, en las cuales se eliminaron las DNA metiltransferasas Dnmt-1 y Dnmt-3b, se observó un incremento en la expresión de *Mmp13*. También en condrocitos de pacientes con osteoartritis los niveles de MMP3, 9 y 13 aumentaron, mientras que sus promotores se desmetilaron (Clark I, et al, 2007).

- Estabilidad del RNAm y expresión de las MMPs.

A nivel postraduccional, la expresión de un gen puede ser regulada por la estabilidad del RNAm en el citoplasma. Esto se logra mediante la unión de proteínas o miRNAs con elementos cis localizados en el RNAm. El más común de estos elementos es la secuencia AUUA en la región 3'UTR del RNAm. Un ejemplo de este mecanismo se observa en el incremento en la estabilidad del RNAm de *Mmp13*, post-tratamiento con cortisol en osteoblastos, el cual ocurre gracias al aumento en la unión de la proteína de unión a sitios AU con la región UTR del RNAm (Yan C y Boyd D, 2007).

III. II Activación del zimógeno.

Las MMPs son sintetizadas como pre-pro-enzimas. El péptido señal dirige las MMPs hacia el espacio extracelular, y es eliminado en la ruta de secreción en la red trans-Golgi. Las MMPs son secretadas de forma inactiva, ya que conservan el pro-dominio y son denominadas pro-MMPs. Estos zimógenos o pro-enzimas latentes contienen un pro-dominio de entre 66 y 91 residuos aminoácidos, en el cual existe una secuencia conservada PRCGXPD, cuya cisteína central interactúa con el Zn^{2+} del sitio activo, mediante su átomo de azufre, el cual reemplaza la molécula de agua catalítica, bloqueando su actividad de proteasa. Cuando este prodominio se elimina, se permite el paso de moléculas de agua que interactúan con el Zn^{2+} del dominio catalítico que posee la región conservada HEXXHXXGXXH, convirtiendo al zimógeno en una enzima catalítica activa. Además de unirse al ion Zn^{2+} , el prodominio se une a diversos sitios del bolsillo S1, región que participa en el acomodo y especificidad del sustrato (Nagase H, et al, 2006).

La activación de las pro-MMPs ocurre a través de la eliminación del prodominio mediante agentes caotrópicos, oxidantes, quelantes, alquilantes, compuestos disulfuro y diversas proteasas como la plasmina, que participa en la activación de las pro-MMP1, 3, 7, 9, 13 y 14, la furina que puede activar a pro-MMP 14 y 11 (**Fig. 6**). Se ha observado que MMPs funcionales son capaces de procesar y activar a otras pro-MMPs. Ejemplos de esto último ocurren la activación de pro-MMP1 por MMP3 (Kim K, et al, 2005), la activación de pro-MMP13 por MMP2 y la activación de pro-MMP2 por MMP14, que se discute más adelante

con su interacción con los TIMPs. Es importante señalar que no todas las MMPs son secretadas como zimógenos, diez pro-MMPs son procesadas dentro de la célula por convertasas similares a furina que reconocen una secuencia RX[K/R]R presente en la secuencia final del pro-péptido, estas enzimas son activadas intracelularmente y posteriormente se insertan a la membrana celular, con el dominio catalítico extracelular activo (Nagase H, et al, 2006).

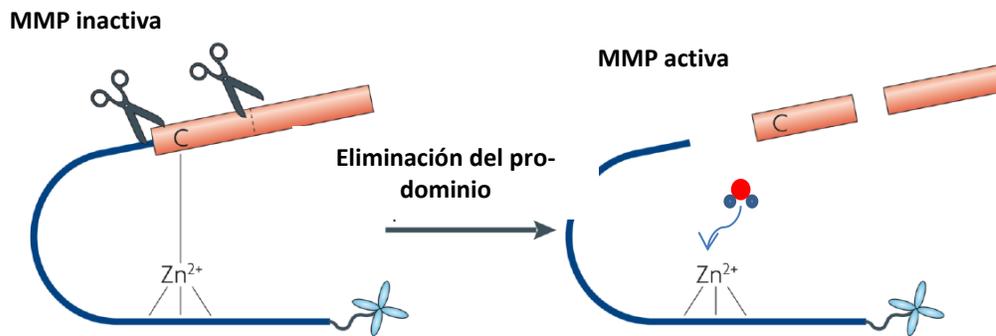


Figura 6. Mecanismo de activación de las MMPs. La interacción del pro-dominio con el átomo de zinc excluye las moléculas de agua y mantiene a la enzima latente. (Modificado de Page-McCaw, et al, 2003).

III.III Inhibición de las MMPs.

Los Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas (TIMPs) y la $\alpha 2$ -macroglobulina son los principales inhibidores endógenos de las MMPs *in vivo*; sin embargo, la $\alpha 2$ -macroglobulina no presenta especificidad en su inhibición de MMPs y se encuentra prácticamente sólo en sangre. Por ello consideraremos más relevante para este trabajo la función de los TIMPs sobre las MMPs. Los TIMPs son proteínas de 184-194 residuos aminoácidos capaces de inhibir a las metaloproteasas MMPs, ADAMs y ADAMTs, por lo tanto también juegan un papel crucial en la regulación de la MEC y la actividad de los demás sustratos de estas metaloproteasas (Brew K y Nagase H, 2010).

La actividad inhibitoria de TIMP1 fue descubierta en 1970 en cultivos de fibroblastos humanos por Bauer et al. Existen cuatro genes parálogos que codifican para TIMPs en humanos. Los cuatro pueden inhibir a todas las MMPs, aunque su afinidad varía, siendo TIMP3 el de mayor espectro de inhibición y TIMP1 el de menor, ya que presenta baja afinidad por las MT-MMPs (Nagase H, et al, 2006).

Los genes para TIMP1, TIMP3 y TIMP4 se encuentran en intrones de los genes para las sinapsinas 1, 3 y 4, respectivamente, mientras que el gen para TIMP2 se encuentra incluido en el gen para DDC8, una proteína altamente expresada durante la espermatogénesis y algunas patologías como daño a la corteza cerebral. Esta topología peculiar ha sugerido una relación en la regulación de la expresión entre estos genes, posiblemente por splicing alternativo del mRNA (Brew K y Nagase H, 2010).

Todos los TIMPs poseen dos dominios, el N-terminal (125 residuos aminoácidos aproximadamente) y el C-terminal (65 residuos aminoácidos aproximadamente). Cada dominio contiene tres puentes disulfuro conservados y el dominio N-terminal posee cuatro residuos Cys1-Thr-Cys-Val4 unidos por uno de estos puentes disulfuro a los residuos Glu67-Ser-Val-Cys70. En este sitio es donde se une el átomo de Zn^{2+} de la región catalítica de la MMP, manteniéndolo alejado de las moléculas de agua, necesarias para la actividad de la MMP. Finalmente, el dominio N-terminal del TIMP impide el posicionamiento del sustrato para formar el complejo de Michaelis. El dominio C-terminal puede formar interacciones con la metaloproteasa y ayudar a la estabilización, aunque en una mínima parte. La función de este dominio podría tener más relación con la especificidad (Brew K y Nagase H, 2010).

De forma interesante, algunos TIMPs, además de inhibir a las MMPs, pueden participar en su activación. A pesar de que el dominio C-terminal de los TIMPs parece no participar en la inhibición de las metaloproteasas, ciertamente es primordial en la estabilización de complejos entre TIMPs y pro-MMPs. Muy importante es notar que, debido a que estas interacciones no dependen del dominio N-terminal, pues la región catalítica de la enzima está siendo bloqueada por el prodominio, se puede unir una segunda molécula de MMP. Un ejemplo de esto último es la interacción entre TIMP2 y pro-MMP2, la cual forma parte de uno de sus mecanismos de activación. En este proceso el dominio catalítico de la MMP14 se une al complejo TIMP2-pro-MMP2, a través del dominio N-terminal de TIMP2, después una segunda molécula de MMP14 se une mediante sus dominios tipo hemopexina, para finalmente cortar el pro-dominio y activar a la pro-MMP2 (Kim K, et al, 2005). TIMP4 también es capaz de formar el complejo terciario MMP14-TIMP4-pro-MMP2, sin embargo, este no es capaz de activar a la pro-MMP2 (Nagase H, et al, 2006; Brew K, 2010).

III.IV Clasificación de la familia de las MMPs.

Para que una proteína sea clasificada como MMP es necesario que posea al menos el prodominio conservado (PRCGVPD) y el dominio catalítico, sin embargo, la mayoría de las MMPs presentan dominios exclusivos que participan en la especificidad de la enzima o en la localización de esta (por ejemplo transmembranal, o soluble) (Parks W, et al, 2004; Fanjul-Fernández M, et al, 2009). Considerando estos dominios, así como la especificidad por los sustratos las MMPs se pueden clasificar en (Fig. 7):

- 1) **MMPs arquetípicas** que incluyen a las MMP1, 3, 8, 10, 12, 13, 18, 19, 20, 22, MColA y MColB. Estas MMPs poseen el péptido señal, el prodominio, el dominio catalítico, una región de unión o bisagra, y un dominio tipo hemopexina (Parks W, et al, 2004; Fanjul-Fernández M, et al, 2009).
- 2) **Colagenasas:** Es importante notar que las 3 principales colagenasas secretadas, MMP1, MMP8 y MMP13, también forman parte de las MMPs arquetípicas, pero son también clasificadas como colagenasas por su gran habilidad y especificidad para cortar a colágenas fibrilares en su estructura de triple hélice, generando fragmentos de $\frac{3}{4}$ y $\frac{1}{4}$. Sin embargo, como el resto de las MMPs son capaces de degradar muchos otros sustratos no pertenecientes a la MEC, por ejemplo interleucinas, factores de crecimiento y otras proteasas (Parks W, et al, 2004; Fanjul-Fernández M, et al, 2009).
- 3) **Gelatinasas:** son las MMP2 y MMP9, también conocidas como gelatinasa A y gelatinasa B, respectivamente. Estas MMPs poseen los mismos dominios que las MMPs arquetípicas, pero además están compuestas por repeticiones del dominio tipo fibronectina, ubicadas después del dominio catalítico, lo cual les permite unir y cortar a la colágena desnaturalizada o gelatina. Además estas proteínas también degradan otras moléculas de la MEC, como colágena tipo IV, elastina, fibronectina, agregano, vitronectina, laminina, e incluso moléculas que no pertenecen a la MEC como pro-TNF- α , TGF- β 1 y pro-IL-18. La MMP2 es expresada constitutivamente en fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, condrocitos y monocitos, mientras que la MMP9 es expresada por macrófagos alveolares, leucocitos

polimorfonucleares y osteoclastos (Parks W, et al, 2004; Fanjul-Fernández M, et al, 2009).

- 4) **MMPs mínimas o matrilisinas.** Estas son las MMPs de menor tamaño, ya que solo presentan el prodominio y el dominio catalítico. Son MMP7 y MMP26, capaces de degradar colágena tipo IV, laminina y entactina, así como otras moléculas ajenas a la MEC (Parks W, et al, 2004; Fanjul-Fernández M, et al, 2009).
- 5) **MMPs ancladas a membrana o MT-MMPs:** Las MMP14, 15, 16 y 24 poseen un dominio de reconocimiento por furina, para su activación intracelular. Además presentan un dominio transmembranal y un dominio citosólico, mientras que MMP17 y MMP25 poseen un carboxilo terminal hidrofóbico que funciona como señal de anclaje a glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Las MT-MMPs se expresan constitutivamente en diversos tejidos, aunque también se ve aumentada su regulación durante ciertas enfermedades, por ejemplo, la expresión de MMP14 se ha asociado a malos pronósticos en algunos tipos de cáncer, ya que su sobreexpresión conlleva la invasión celular y metástasis. Las GPI MT-MMPs se expresan en cerebro, colon, ovario, testículos y en los leucocitos, en el caso de la MMP17 y en leucocitos, pulmones y en bazo, para la MMP25. MMP25 puede procesar gelatina, colágena tipo IV, fibronectina, fibrina y proteoglicanos. La MMP14 también es considerada una colagenasa potente a nivel pericelular (Parks W, et al, 2004; Fanjul-Fernández M, et al, 2009).

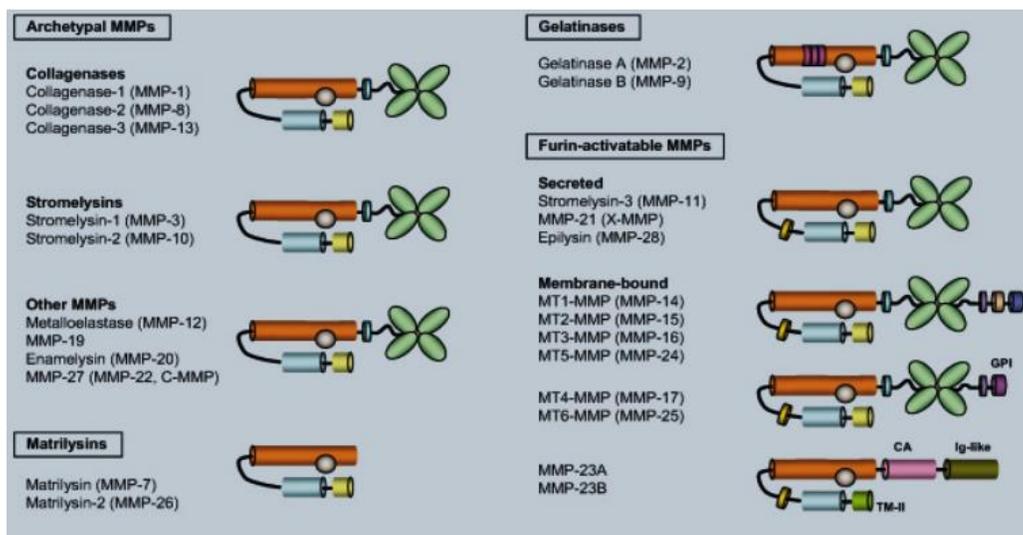


Figura 7. Clasificación de las MMPs con base en sus dominios estructurales.

IV. FIBROSIS PULMONAR.

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) se caracterizan por presentar diversos grados de inflamación y fibrosis, lo que provoca un detrimento en el intercambio gaseoso. Muchas son de etiología conocida, y son producidas por inhalación de partículas orgánicas o inorgánicas, inducidas por drogas, o están asociadas a enfermedades reumatológicas. Existen otras enfermedades pulmonares intersticiales difusas de etiología desconocida (Thickett DR, et al, 2011). La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) representa la entidad más común y agresiva de las EPID; es una enfermedad crónica, progresiva y letal, de etiología desconocida (Pardo A. y Selman M., 2006; Pardo A. y Selman M., 2002; Selman M. et al, 2001). Actualmente, la teoría más aceptada sobre el desarrollo de esta enfermedad postula que un daño epitelial pulmonar crónico y/o desconocido lleva a una cicatrización anormal con proliferación de fibroblastos, los cuales secretan los componentes de la MEC (principalmente colágenas fibrilares). Esto último probablemente se deba a una comunicación aberrante entre las células epiteliales y mesenquimales. Además de estas características en la FPI también se observa una elevada apoptosis epitelial, así como una gran cantidad de macrófagos alveolares y neutrófilos, junto con la formación de focos de fibroblastos (Thickett DR, et al, 2011). Estos últimos son agregados de fibroblasto y miofibroblastos que se ubican por debajo de las rupturas de la membrana basal epitelial, que sintetizan y secretan colágenas intersticiales, así como otras proteínas de la MEC del pulmón. La acumulación de estas moléculas es un proceso que depende del balance entre la síntesis y degradación de factores de crecimiento y citocinas profibrosantes que activan a los fibroblastos; citocinas antifibróticas que inhiben la producción de proteínas de la MEC; proteinasas, principalmente MMPs, que degradan y procesan proteínas tanto de la MEC, como no pertenecientes a esta (Craig V, et al, 2013).

Por otro lado el rompimiento de la membrana basal es un evento muy importante en la patología, y ha sido postulado que la migración de fibroblastos y miofibroblastos hacia los espacios alveolares ocurre a través de la membrana basal desintegrada (Pardo A. y Selman M. et al, 2006, Selman M. et al., 2001). Además, existen evidencias de que la desorganización de la membrana basal, es un estímulo inicial que induce un cambio en el fenotipo de las células epiteliales transformándolas en células mesenquimales por un

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

IV.I MMPs en la Fibrosis Pulmonar Idiopática, y en modelos animales experimentales de fibrosis pulmonar.

Mientras que la característica principal de la FPI es la acumulación anormal de MEC, existe evidencia del aumento en la producción de varias MMPs, esto resulta paradójico, y nos indica que la regulación del metabolismo de la MEC es complejo y que la fibrosis no se puede visualizar como un simple desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la MEC. Numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han evidenciado que las MMPs juegan papeles muy específicos en la FPI y que además de regular el metabolismo de la MEC, orquestan otros procesos cruciales involucrados en la FPI, como la activación y/o apoptosis del epitelio, la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, la transición epitelio-mesénquima y la inflamación. El papel específico de estas enzimas es incierto, ya que poseen diversos efectos sobre la MEC y otros sustratos como quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento, receptores, integrinas, etc. (Thickett DR, et al, 2011). Aun así, ha sido posible establecer el papel de algunas MMPs en el desarrollo de la enfermedad, a partir de modelos animales experimentales de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y de estudios *in vitro*.

La bleomicina pertenece a una familia de glicopéptidos, antibióticos, hidrosolubles aislados de la bacteria *Streptomyces verticillus*. La bleomicina ha sido ampliamente usada en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, sin embargo su uso como tratamiento ha sido ampliamente cuestionado debido a que su peor efecto secundario es la neumotoxicidad, presentando casos de fibrosis pulmonar o algún tipo de enfermedad intersticial pulmonar en el 46% de los casos tratados (Morales M, et al, 2015). Sin embargo, esta característica la ha convertido en la droga más utilizada para desarrollar el modelo experimental para el estudio de la fibrosis pulmonar en animales más empleado.

El daño celular que provoca la bleomicina ocurre a través de 2 mecanismos, uno es la generación de especies reactivas de oxígeno y el otro es el corte directo del DNA, lo que causa apoptosis. *In vitro*, la estimulación de la línea celular de epitelio alveolar de ratón MLE12 con 100 mU de bleomicina causa apoptosis masiva después de 24h del tratamiento. La enzima hidrolasa de bleomicina es fundamental para inhibir la acción de las bleomicinas; sin embargo, esta enzima no se expresa en el tejido epitelial pulmonar, ni en piel. Por ello la instilación de bleomicina dirigida al pulmón a través de la tráquea produce neumonitis intersticial, que puede progresar hacia fibrosis pulmonar y también es utilizada en modelos de escleroderma (fibrosis en piel). El daño pulmonar inducido por bleomicina ocurre en dos fases: la primera consta de un componente predominantemente inflamatorio, seguido de un componente fibrosante entre la tercera y cuarta semana. Desde el día seis hasta un mes, hay un aumento sostenido de linfocitos que pueden influenciar la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena, liberando factores de crecimiento profibrogénicos. A los 14 días postinstilación se pueden observar cambios difusos y multifocales que consisten en hiperplasia epitelial y fibrosis intersticial e intraalveolar. Después de 21 días se pueden observar focos grandes de fibrosis en forma difusa, caracterizados por la presencia de fibroblastos y miofibroblastos y por el depósito de colágenas fibrilares (Cabrera S, et al, 2006).

La generación de ratones modificados genéticamente deficientes en una Mmp específica, ha contribuido al esclarecimiento de su función en el contexto del organismo completo, durante el desarrollo de fibrosis pulmonar (Cabrera S, et al, 2007). A continuación se describe el fenotipo de algunos ratones mutantes deficientes en distintas MMPs después del tratamiento con bleomicina, y la localización celular y niveles de expresión, de éstas MMPs en el pulmón de humano durante la FPI:

- **MMP1**

Principalmente se expresa en células del epitelio alveolar y bronquiolar en pacientes con FPI. A pesar de ser una de las principales enzimas capaces de degradar colágenas fibrilares en el humano. la expresión de esta proteína se encuentra significativamente aumentada en tejido pulmonar de pacientes con FPI. Sin embargo, la MMP1 está ausente en el espacio intersticial, que es donde ocurre el depósito de colágenas fibrilares

y su expresión esta aumentada en células epiteliales. El papel de MMP1 en el epitelio no se conoce con precisión, pero se ha sugerido que puede jugar un papel importante en la migración del epitelio alveolar después del daño (Pardo A. y Selman M., 2006). Los ratones no tienen el gen que codifica para MMP1; sin embargo, hay un gen análogo que se ha denominado *Mcola* o *Mmp1a*. *Mcola* no se expresa en estado adulto y parece no tener un papel equivalente a la MMP1 de humano. El ratón deficiente de *Mcola* se ha generado, es viable y fértil, sin embargo el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, no se ha desarrollado en este mutante (Fanjul-Fernández M, et al, 2013).

- **MMP3**

En el pulmón, la MMP3 se expresa en células epiteliales, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos alveolares y monocitos. Es capaz de procesar colágena tipo IV y diversas moléculas de la membrana basal (**Fig. 8**). Se encuentra elevada en células epiteliales y bronquiolares, fibroblastos intersticiales, macrófagos alveolares y otros leucocitos en pacientes con FPI. El ratón deficiente en *Mmp3* presenta protección contra la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y su sobreexpresión en el pulmón conlleva a un incremento en la sensibilidad hacia la misma (Yamashita CM, et al, 2011).

- **MMP7**

En pulmón, la MMP7 se expresa en células epiteliales del pulmón, fagocitos mononucleares y fibrocitos (**Fig. 8**). En pacientes con FPI está se encuentra elevada en plasma y lavado bronquioalveolar. Es interesante notar que se han observado dos polimorfismos de un solo nucleótido, asociados a la región del promotor de *Mmp7* que aumentan su transcripción y se asocian al desarrollo de FPI. Además cuando *Mmp7* está ausente en el ratón, este se protege contra la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (Zuo F, et al, 2002).

- **MMP8**

Es también conocida como colagenasa de neutrófilos ya que se transcribe y traduce en los precursores de neutrófilos polimorfonucleares (NPM), después es almacenada como pro-MMP8 en gránulos específicos de NPM. Posteriormente, a la activación de estos últimos, la pro-MMP8 es liberada al espacio extracelular en donde es activada mediante el mecanismo de *switch de cisteína* (Craig V, et al, 2013). En pulmón, la MMP8 es expresada por neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos, células epiteliales del pulmón y fibroblastos, células dendríticas, células NK y células mesenquimales (**Fig.8**). En otros tipos celulares la MMP8 es regulada a nivel transcripcional por TGF β 1; TNF- α en fibroblastos; por la Interleucina 1 β (Il-1 β) y el ligando de CD40 en fagocitos mononucleares. Además de la MMP8 de neutrófilos de 80 KDa y su forma de 75-KDa activada (desprovista del pro-dominio), otras especies de MMP8, con un peso molecular mucho más pequeño (40-60 kDa) han sido identificadas. Estas formas están menos glicosiladas, en comparación con la MMP8 derivada de neutrófilos. Otros experimentos han revelado que este alto grado de glicosilación que ocurre en los neutrófilos, se asocia con el almacenamiento de la enzima en los gránulos intracelulares (CraigV, et al, 2015).

La proteína MMP8 se encuentra elevada en plasma, homogenados de pulmón y lavado bronquioalveolar de pacientes con FPI, específicamente en macrófagos y células epiteliales bronquiolares, pero disminuida en células epiteliales alveolares. Sin embargo, es importante notar que este aumento no correlaciona con el detrimento de la función pulmonar o la mortalidad de los pacientes con FPI (Craig V, et al, 2014).

Mmp8 cumple un papel anti-inflamatorio en el modelo de daño pulmonar agudo por LPS. Además disminuye la mortalidad en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por hiperoxia, mediante la inactivación de Mip-1 α . MMP8 también posee una actividad crucial durante la cicatrización pues el ratón *Mmp8*^{-/-} presenta un retraso en la infiltración de neutrófilos en heridas de piel, lo que provoca un retraso en la resolución de la inflamación, comparado con el ratón WT, debido a alteraciones en la señalización por TGF- β (Gutiérrez-Fernández A, et al, 2007).

Aunque MMP8 es una de las principales colagenasas y por ello podría esperarse que su presencia limitaría la respuesta fibrosante en el pulmón, García Prieto et al mostraron que la MMP8 reduce la inflamación pero promueve la respuesta fibrosante post daño por bleomicina, mediante el procesamiento de IL-10. El ratón deficiente en MMP8 muestra protección contra la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, sin embargo presenta acumulación de leucocitos en el pulmón durante la etapa inflamatoria. El papel profibrosante de MMP8 se ha relacionado con su capacidad de procesar diversas moléculas, por ejemplo, es capaz de reducir los niveles de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIB-1 α) y de la proteína inducible por interferón γ -10 (Cxc10), ambas proteínas quimiotácticas para fagocitos mononucleares (Tager AM, et al, 2004; Jiang D, et al, 2004). Además MMP8 procesa a la Interleucina -10 (IL-10), la cual puede inhibir a TGF β , por lo que la ausencia de MMP8 puede llevar a la acumulación de IL-10 y disminuir el desarrollo de la enfermedad (García-Prieto et al, 2010). MMP8 también puede promover la fibrosis pulmonar al aumentar la migración de fibrocitos hacia el pulmón. Los fibrocitos son células circulantes, derivadas de la médula ósea, capaces de expresar CD45 y colágena y al ser reclutados a una herida en el pulmón promueven respuestas de proliferación de fibroblastos.

- **MMP9**

Conocida también como gelatinasa B, se expresa por leucocitos, fibroblastos y células epiteliales y endoteliales. En pacientes con FPI se encuentra elevada en lavado bronquioalveolar y se localiza en macrófagos alveolares intersticiales, células epiteliales metaplásticas y su forma pro-MMP9 se almacena en gránulos terciarios de neutrófilos polimorfonucleares (**Fig.8**) (Atkinson JJ, et al, 2003). El ratón deficiente de *Mmp9* no mostró diferencias en comparación con el silvestre en la respuesta fibrosante pulmonar después del tratamiento con bleomicina, pero interesantemente, se observó que la *Mmp9* era necesaria para la bronquilización (migración de las células del epitelio bronquiolar hacia las zonas dañadas del epitelio alveolar) (Betsuyaku T, et al, 2000). Sin embargo, la sobreexpresión de *Mmp9*, específicamente en macrófagos, bajo la

regulación del promotor del receptor Scavenger, resultó en una protección frente al desarrollo de fibrosis pulmonar en los ratones transgénicos (Cabrera S, et al, 2007).

- **MMP13**

La expresan fibroblastos y es regulada a nivel transcripcional por TGF β 1, Il-1 β , Il-6 y TNF α . Además es importante para este trabajo notar que MMP2 y MMP14 son capaces de procesar y activar a pro-MMP13, los niveles de proteína de MMP13 se encuentran incrementados en pulmones de pacientes con FPI. El ratón deficiente en Mmp13 presenta un aumento en la respuesta inflamatoria del pulmón, en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (D'Armiento JM, et al, 2010). Sin embargo, en modelos de fibrosis pulmonar inducida por radiación e hiperoxia se observa una disminución en la sensibilidad del pulmón a la enfermedad. También es interesante mencionar que en un modelo de fibrosis hepática inducida por ligadura de ductos biliares la MMP13 promueve el desarrollo de fibrosis, aunque su expresión en macrófagos es necesaria para la resolución de la enfermedad (Sen AI, et al, 2010). La MMP13 se expresa en el esqueleto durante el desarrollo embrionario, así como en carcinomas humanos, en condrocitos, y en células sinoviales en artritis reumatoide y osteoartritis. Debido a su relevancia en la regulación del tejido óseo, los ratones deficientes de Mmp13 presentan defectos considerables en el crecimiento de las placas del cartílago con un marcado aumento de los dominios hipertróficos, así como un retraso en la osificación endocondral y en la formación y vascularización de los centros primarios de osificación. Cabe hacer notar que en estos ratones deficientes de MMP13 también existe una acumulación exagerada de la colágena intersticial (Inada M, et al, 2004). Con relación al papel de la MMP13 en la fibrosis pulmonar, en un modelo de daño pulmonar por hiperoxia, se determinó que no existen diferencias en el grado de fibrosis o acumulación de colágena entre los ratones silvestres y aquellos deficientes en Mmp13, sin embargo, estos últimos mostraron un aumento en la Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1 (MCP-1), lo que llevó a un aumento de células inflamatorias en el lavado bronquio-alveolar (D'Armiento J, et al, 2010). Por otro lado, se ha investigado el papel de MMP13 en la fibrosis pulmonar, mediante el análisis de los efectos de la deficiencia de MMP13 en ratones después la irradiación torácica de 20

Gy (*greys* (Gy) o *sieverts* (Sv) para el tejido biológico, donde 1 Gy o 1 Sv es igual a 1 joule por kilogramo). Se encontró que los ratones deficientes de MMP13 desarrollaron menos fibrosis pulmonar que sus contrapartes de tipo silvestre o WT, además de una inflamación pulmonar aguda atenuada. Además la supervivencia de los ratones deficientes, fue significativamente mayor en comparación con sus respectivos controles WT, por lo tanto estos datos sugieren que la Mmp13 podría jugar un papel profibrosante (Sen AI, et al, 2010).

Sin embargo es importante recalcar que diferentes tipos celulares pueden tener papeles diferentes en la fibrosis pulmonar, de tal manera que la expresión de alguna MMP en un tipo celular puede ser profibrosante, mientras que su expresión en otro tipo celular puede ser antifibrosante. De manera similar, las MMPs pueden tener una función en etapas tempranas de la enfermedad y otra distinta en el desarrollo o en la resolución de la fibrosis pulmonar. Por lo tanto resulta casi imposible asignar un papel único como profibrosante o antifibrosante a alguna MMP en específico.

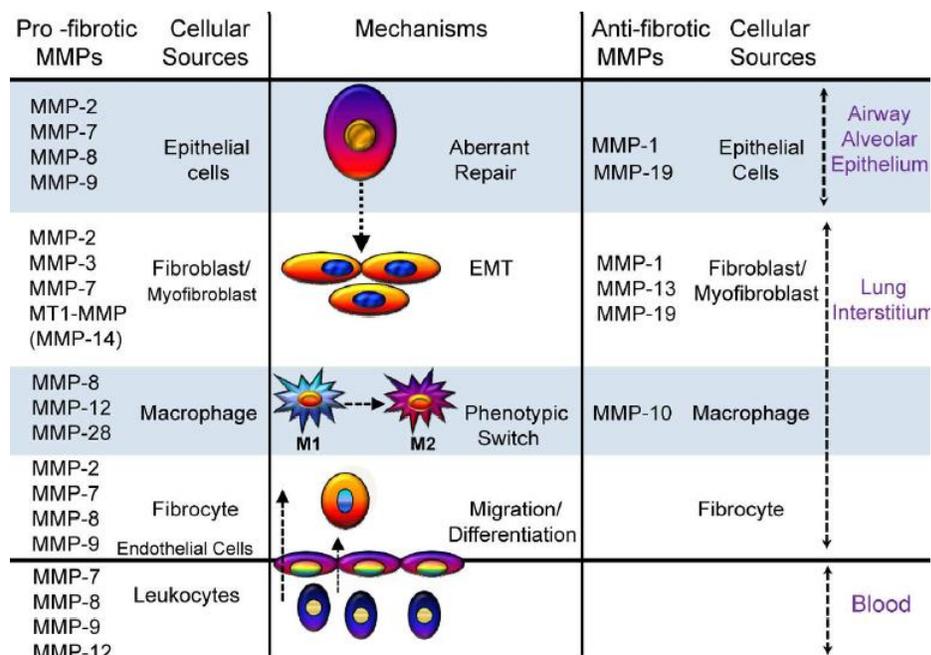


Figura 8. Posible mecanismo de las diferentes MMPs mediante el cual regulan la fibrosis pulmonar en el modelo murino. Se muestran los principales tipos celulares que las expresan durante la enfermedad, así como los posibles procesos en los que participan para realizar su función (Craig, 2015).

IV.II Generación del ratón modificado genéticamente doble deficiente de las enzimas MMP8 y MMP13.

Como se mencionó previamente, el estudio de modelos genéticamente modificados deficientes de MMPs ofrece la oportunidad de identificar funciones esenciales de una MMP y de validar posibles sustratos al buscar los productos procesados en el animal control y proteínas no procesadas en el animal mutante. Al menos 14 ratones mutantes para alguna MMP se han generado, pero no todos han sido usados para estudiar en modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

Recientemente, en colaboración con el laboratorio del Dr. Carlos López Otín de la Universidad de Oviedo, España, se ha generado un ratón mutante doble deficiente de dos enzimas, MMP8 y MMP13. Este modelo animal representa un novedoso sistema con degradación colagenolítica deficiente dado que la MMP8 y la MMP13 son las principales colagenasas en roedores, ya que carecen de un análogo de MMP1 presente en el humano. Los genes que codifican para la MMP8 y para la MMP13 se localizan en el cromosoma 9 en el ratón; el gen que codifica para la MMP8 tiene la localización: NC_000075.6 (7272514-7283333pb) y el gen que codifica para la MMP13 tiene la localización: NC_000075.6 (7558429-7568486 pb) (Fig. 9).

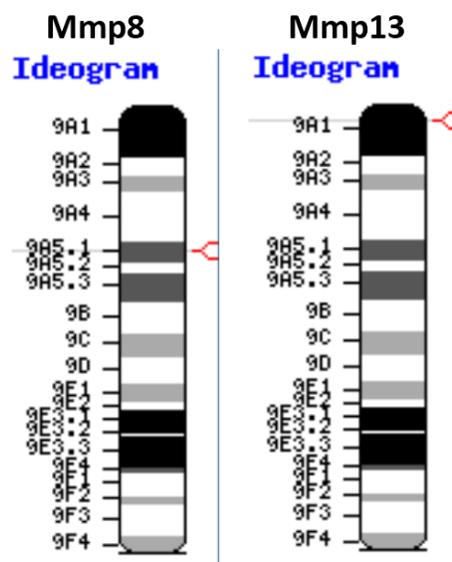


Figura 9. Localización de los genes que codifican para la Mmp8 y Mmp13 en el genoma de *Mus musculus*. (Genome map viewer <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>)

Para eliminar la expresión del gen de la MMP8 se interrumpió el exón 2, utilizando un cassette de neomicina y para bloquear la expresión del gen de la MMP13 se interrumpió el exón 5 con un cassette de higromicina, como se muestra en la figura 2. Debido a la cercanía entre los dos genes en el cromosoma 9, la generación de ratones MMP8-MMP13 dKO mediante cruces directos *Mmp8*^{-/-} x *Mmp13*^{-/-} no fue una opción viable, pues al encontrarse tan cerca ambos genes, la recombinación homóloga durante la meiosis podría generar ratones portadores de un gen silvestre y uno deficiente. En su lugar, se utilizaron células madre del ratón *Mmp8*^{-/-} para interrumpir la expresión del gen *Mmp13* con la construcción del cassette de higromicina (Fig. 10).

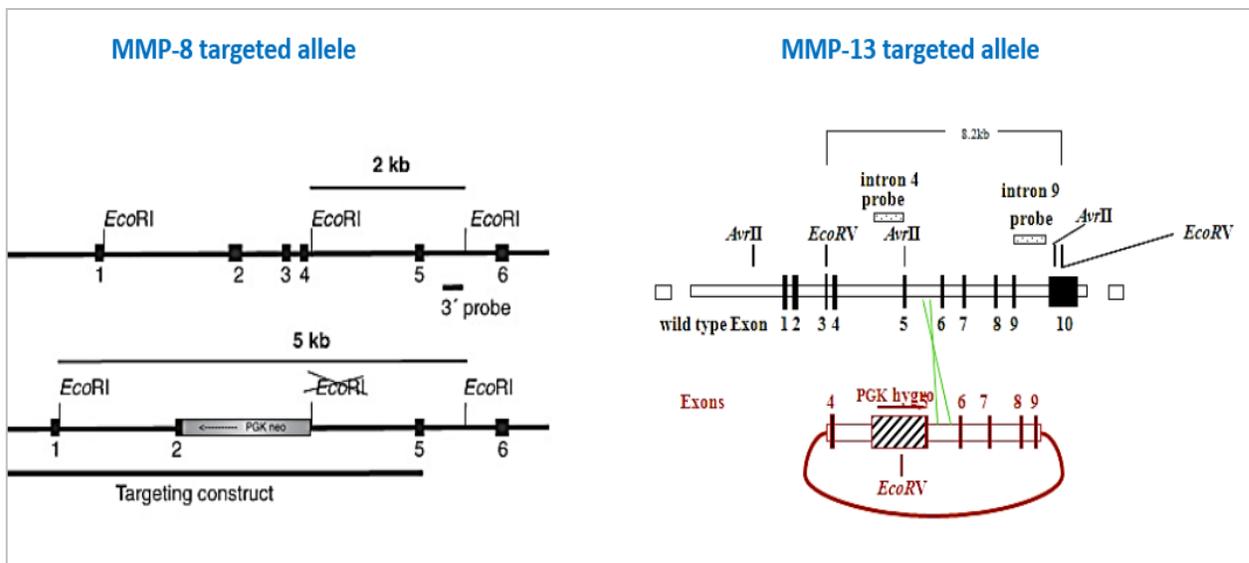


Figura 10. Mapa de construcción para interrumpir la expresión de MMP8 y MMP13 y generar el ratón doble mutante MMP8^{-/-} - MMP13^{-/-}.

El fondo genético del ratón doble deficiente MMP8-MMP13 es C57BL6. Los ratones son fértiles y no presentan complicaciones durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, no existen datos publicados sobre el fenotipo normal o en patologías de estos ratones doble deficientes. Se estableció una colonia de ratones doble deficientes para MMP8 y MMP13, así como su contraparte silvestre en las instalaciones del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Estas colonias se originaron identificando los alelos mutantes por medio de una PCR específica y los individuos homocigotos doble deficientes fueron utilizados para reproducción.

La deficiencia de ambas enzimas MMP8 y MMP13 en el pulmón, resultará en una fibrosis más severa caracterizada por un depósito excesivo de matriz extracelular, en comparación con sus respectivos controles silvestres.

❖ **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el desarrollo, progresión y resolución de la fibrosis pulmonar experimental inducida por bleomicina en el ratón mutante doble deficiente de las enzimas MMP8 y MMP13, en comparación con el ratón silvestre (WT).

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Inducir fibrosis en los ratones doble deficientes de las proteasas MMP8-MMP13 y WT, por instilación intratraqueal de bleomicina.
2. Analizar los cambios morfológicos en el pulmón durante la etapa inflamatoria, fibrosante y de resolución de la fibrosis en ratones mutantes y silvestres.
3. Cuantificar el contenido de hidroxiprolina, como biomarcador de colágena en el pulmón en ratones mutantes y silvestres, durante la etapa fibrosante y de resolución.
4. Evaluar el índice de severidad de fibrosis pulmonar en el pulmón de ratones mutantes y silvestres, durante la etapa inflamatoria, fibrosante y de resolución de la fibrosis.
5. Evaluar la expresión de distintas MMPs (McolA, Mmp2, Mmp8, Mmp9, Mmp7, Mmp13 y Mmp14), TIMPs (Timp1 y Timp3) y marcadores profibrosantes (Col1a1, Col3a1, LOX1) en el pulmón de ratones mutantes y silvestres, tanto en condiciones basales, como patológicas, después de la inducción de fibrosis pulmonar con bleomicina.
6. Determinar por IHC la localización de MColA, MMP2, MMP8, MMP9, MMP13 y TIMP1.

Población de estudio.

Ratones hembra y macho de la cepa C57BL6 con genotipo silvestre y mutante MMP8-MMP13 doble deficientes, fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y todos los procedimientos realizados con los animales fueron desarrollados de acuerdo al comité de ética de dicha institución. Se usaron ratones de 8 a 10 semanas de edad. Para determinar el genotipo de cada individuo, se purificó DNA genómico de cada individuo, a partir de un fragmento de la cola. El DNA fue utilizado como templado para a partir de una PCR de punto final, amplificar los fragmentos correspondientes al alelo WT, y a los alelos mutantes, utilizando oligonucleótidos específicos. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Purificación de DNA.

El genotipo de cada uno de los ratones se determinó por PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) usando como templado ADN purificado de un fragmento pequeño de la cola de cada individuo, de acuerdo al siguiente protocolo:

- Se cortó un trozo de cola muy pequeño de cada ratón y se colocó en tubos de 200µl para PCR.
- Añadí 75µl de Buffer HOT-SHOT (250ul de NaOH 5M, 20ul EDTA pH 8 0.5M) a cada tubo.
- Se incubaron las muestras durante 60 minutos a 99°C.
- Añadí 75µl de Buffer de neutralización (2ml Tris 1M pH 7.4).
- Los almacené en refrigeración a 4°C.

Determinación del genotipo por PCR.

Para determinar el genotipo de los individuos experimentales, se usaron *primers* específicos para los alelos silvestres de MMP13 y MMP8, y para sus respectivos alelos mutantes, así como un primer dirigido a un segmento de la secuencia del gen de resistencia a higromicina como un método para corroborar el genotipo de los ratones. La secuencia de los *primers* que se utilizaron se muestra a continuación:

MMP8

Forward Primer	MMP-8 HT F4	sequence5' – ATG TTC TAT GGC GTT GTT CTT TCA -3
Reverse Primer 1	MMP-8 WT R3	sequence 5'- CAG GGC TAG GTT TTC TTC AGC A -3'
Reverse Primer 2	MMP-8 KO R5	sequence 5'- GGA CAG CAA GGG GGA GGA T- 3'

MMP13

Forward Primer	MMP-13HTE5	sequence5' – GGA AGC ATG AAA TGG CTT TTGC -3
Reverse Primer 1	MMP-13WTE5	sequence 5'- GTA GGT AAC TGA TTC TTT ATG -3'

HYG

Forward Primer	sequence5' – GCG GGA GAT GCA ATA GGT CA -3
Reverse Primer 1	sequence 5'- CTC GGA GGG CGA AGA ATC TC -3'

Para la reacción, se preparó la mezcla de los componentes de la PCR en las cantidades que se indican:

MMP8

H2O.....	5.60µl
Buffer.....	1.00µl
MgCl ₂	0.30µl
Forward Primer HT (25µM).....	0.50µl
Backward Primer KO(25µM).....	0.25µl
Backward Primer WT(25µM).....	0.25 µl
dNTPs.....	1.00µl

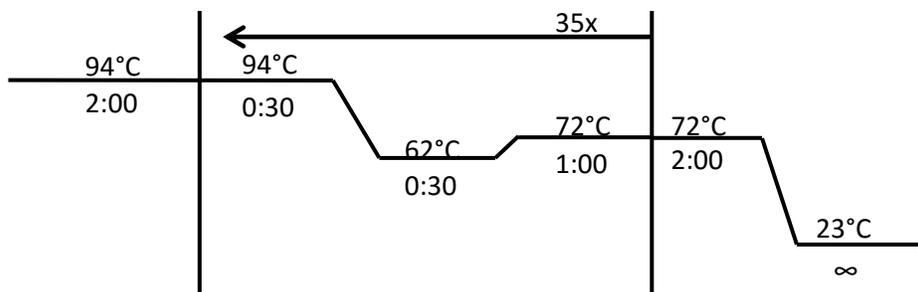
Polimerasa Taq.....0.10µl
 DNA.....1.00µl

MMP13

H2O.....6.10µl
 Buffer.....1.00µl
 MgCl₂.....0.30µl
 Forward Primer HT (25µM).....0.25µl
 Backward Primer WT (25µM).....0.25µl
 Backward Primer KO(25µM).....0.25 µl
 dNTPs.....1.00µl
 Polimerasa Taq.....0.10µl
 DNA.....1.00µl

El volumen final de cada muestra fue de 10µl. Los tubos fueron incubados en el termociclador (iCycler Bio Rad). El termociclador es el aparato que permite llevar a cabo de forma automática y reproducible la sucesión de ciclos de temperatura necesarios para la PCR. Las condiciones en las que se desarrolló la reacción en el termociclador fueron las siguientes:

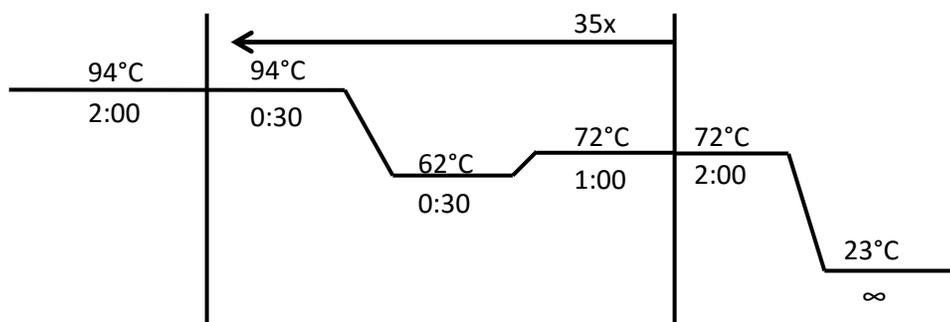
Condiciones del termociclador para MMP8



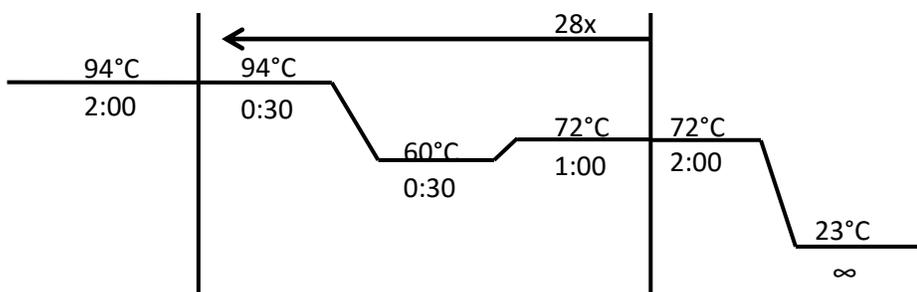
Se desnaturaliza la doble cadena de DNA a 94°C, se alinean los primers con su secuencia complementaria específica a 62°C para que la DNA polimerasa pueda realizar la etapa de elongación o extensión a 72°C. Esto se repite 35 veces y finalmente se mantiene a 72°C por

2 minutos para que cualquier cadena que esté incompleta sea totalmente sintetizada. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis, en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio (2µg), y el tamaño de los productos fue comparado con el marcador de pesos moleculares de 100 pb (Invitrogen). Se registró la imagen de cada uno de los geles con el fotodocumentador (ChEMIDOC BioRad) y se generó una base de datos en Excel, donde se registró el número de ratón, su género y su genotipo, para posteriormente establecer los grupos experimentales.

Condiciones del termociclador para MMP-13.



Condiciones del termociclador para Hyg.



Modelo animal de fibrosis pulmonar experimental inducida por bleomicina.

Para inducir fibrosis pulmonar con bleomicina, un antineoplásico que induce apoptosis en células del epitelio alveolar, inflamación y fibrosis, ratones mutantes MMP8-MMP13 doble deficientes y controles WT fueron anestesiados con pentobarbital sódico, para recibir

bleomicina (0.05 U), por vía intra-traqueal en dosis única. La droga fue administrada en un volumen de 50µl, los animales control fueron instilados con el mismo volumen de solución salina. Los animales fueron sacrificados en distintos períodos de tiempo (1, 4, 10 y 12 semanas post-tratamiento) para examinar la respuesta inflamatoria, fibrosante y la resolución o reversión de la fibrosis. Después del sacrificio, se obtuvieron los pulmones y se evaluó la gravedad de la fibrosis a través de la medición semicuantitativa de las lesiones y la determinación de hidroxiprolina (Fig. 14).

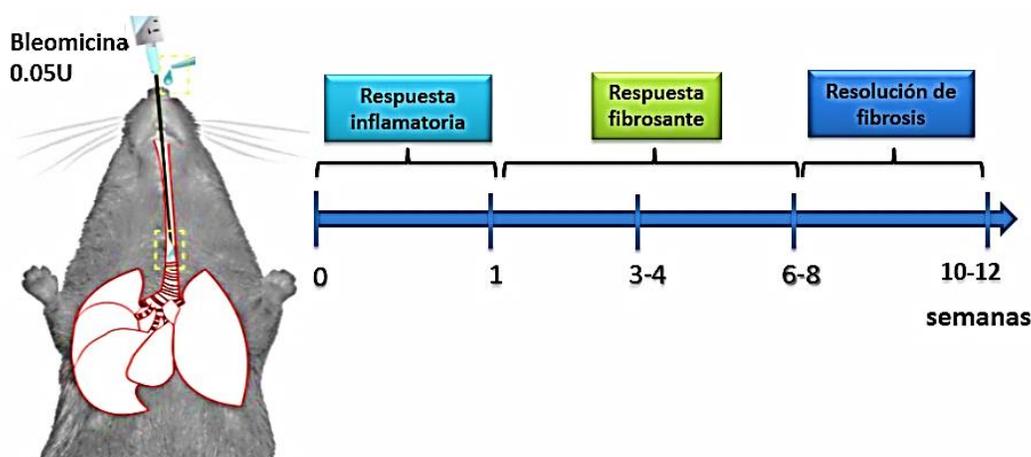


Figura 11. Curso temporal del modelo experimental de fibrosis inducida por bleomicina.

Evaluación semicuantitativa del porcentaje de fibrosis.

El pulmón derecho fue fijado por instilación a presión constante con paraformaldehído al 4% en PBS. Los tejidos fueron embebidos en parafina y se hicieron cortes de 3µm. La extensión y grado de las lesiones, así como el porcentaje de inflamación y fibrosis fueron evaluados después de la tinción de Masson y hematoxilina-eosina. El *score* de fibrosis fue determinado al multiplicar la extensión de la lesión por el porcentaje de fibrosis.

Cuantificación de hidroxiprolina pulmonar.

Se realizó mediante el método de Woessner. Para ello se extrajo el pulmón izquierdo de cada uno de los ratones a analizar y se almacenó a -80°C. Para iniciar el análisis del

pulmón, este se homogeneizó en un tubo de 2ml con 500µl de agua. Después se transfirió el homogenado completo a tubos de ensayo con tapa, en los que se añadió 500µl de HCl 12N a cada tubo. Para permitir la completa degradación de los péptidos hasta aminoácidos, se incubaron los tubos a 110°C por 18 hrs.

Pasado el tiempo de incubación se aforó cada tubo a 1ml y se pasó el ml completo a tubos eppendorf de 1.5ml, agitando y re suspendiendo los residuos. Se preparó la Cloramina T y el reactivo de Ehrlich con las siguientes cantidades:

Reactivo de Ehrlich

- 1.5g Paradimetilaminobenzaldehído
- 6.6ml n-propanol
- 3.3ml ácido perclórico

Cloramina T

- .14g Cloramina T
- 8ml Buffer de citratos
- 1ml agua
- 1ml n-propanol

Cada muestra se preparó en una dilución 1:1 con Buffer de citratos. Para elaborar la curva se pesaron 10mg de hidroxiprolina y se disolvieron en 10ml de agua. Después se tomaron 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µl de esta solución y se aforaron a 100µl en tubos de 500µl. Para la curva con menor concentración, se hizo una dilución 1:10 de la original y a partir de esta se tomaron 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µl de esta solución y se aforaron a 100µl en tubos de 500µl.

En una placa de 96 pozos se colocaron 100µl de Cloramina T en cada pozo a utilizar (un pozo por muestra y cada punto de la curva, por duplicado) con 10µl de muestra o de cada punto de la punta de hidroxiprolina. Una vez colocada la curva y cada muestra con la Cloramina T, se incubó a temperatura ambiente por 15min. Pasado el tiempo, se agregó a

cada pozo 100µl de reactivo de Ehrlich y se incubó a 65°C por 20min. Finalmente, se leyó en un espectrofotómetro a 550nm y se analizaron los resultados.

Inmunohistoquímica.

La localización de MMP8 y MMP13, así como diversas proteínas de la matriz se examinaron por inmunohistoquímica. Para eliminar la actividad de peroxidasa endógena, los tejidos se incubaron con H₂O₂ (3%) en metanol por 10 min. Para evitar uniones inespecíficas antígeno-anticuerpo, los tejidos fueron tratados con suero de borrego diluido 1:100 en PBS por 20 minutos y con solución bloqueadora (Dako, Corp., Carpinteria, CA). Los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario por 18 horas a 4 °C y posteriormente con un anticuerpo secundario marcado con biotina y un complejo estreptavidina-peroxidasa (BioGenex). Para revelar, los tejidos se incubaron con 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, BioGenex) como cromógeno, en buffer de acetatos con 0.05% de H₂O₂ y finalmente los tejidos fueron contra-teñidos con hematoxilina. En experimentos paralelos el anticuerpo primario fue reemplazado por suero no inmune como un control negativo.

- Las laminillas se desparafinaron en xilol por 20 minutos.
- Se rehidrataron en etanol a diversas concentraciones.
- Se les realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS.
- Para desenmascarar el antígeno las laminillas se incubaron en buffer de citratos y se hirvieron de 3 a 5 minutos en horno de microondas.
- Después de haber hervido las muestras se dejaron enfriar por 25 minutos en hielo.
- Lavado con PBS de 5 minutos.
- Se incubaron las laminillas con solución bloqueadora (Universal Blocking Reagent Biogenex Cat # HK085-5K) por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se incubaron 30 minutos con suero de borrego diluido 1:100 a temperatura ambiente.
- Se retiró el suero de borrego y se incubó por toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C.

- Las laminillas se lavaron dos veces por 5 minutos en PBS-T.
- Se aplicaron 100µl del anticuerpo secundario biotinilado y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se les realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS-T.
- Se aplicó el cromógeno AEC (Amino-etil-carbazol) y se monitoreo observando al microscopio, para detener la reacción positiva del anticuerpo secundario en cuanto se observara y evitar una sobre tinción.
- Para contrateñir se utilizó hematoxilina y carbonato de sodio.

Perfil de expresión génica.

El RNA total de pulmón se purificó usando Trizol (Life Technologies, NY), de acuerdo al protocolo del fabricante. Un microgramo de RNA fue tratado con 1U de DNAsa para evitar contaminación con DNA genómico; este RNA será utilizado para la síntesis de cDNA, utilizando el kit *Advantage RT for PCR* (Clontech, Palo Alto CA). Se evaluó la expresión de distintos marcadores de fibrosis específicamente en pulmón, utilizando sondas Taqman específicas (i-Cycler iQ Detection System, Bio-Rad, Hercules, CA).

Purificación y cuantificación de proteína.

Se realizó una cuantificación de proteínas con el reactivo de Bradford:

- El pulmón fue homogenizado en 1ml de PBS 1X y el homogenizado se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 15 min.
- Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos.
- Para cuantificar la concentración de proteína, el reactivo Bradford fue diluído en agua desionizada, 1:5.
- Se depositaron 200µl de reactivo de Bradford diluído y filtrado en cada pozo a utilizar, en una placa de 96 pozos.
- Para la curva estándar, se utilizó albúmina 1µg/ µL. Para cada muestra problema, se preparó una dilución 1:10 del homogenizado del tejido y se cuantificaron 10 µL de ésta dilución, por duplicado.

- Se incubaron las muestras 15 min a temperatura ambiente y se midió con el espectrofotómetro la absorbancia a 550nm.
- Se graficaron los valores obtenidos de absorbancia de las concentraciones conocidas de albumina.
- A partir de la fórmula $y=mx +b$, y basando en las concentraciones conocidas de albúmina, se determinó la concentración de proteína de cada muestra x , donde $x=y-b/m$, donde m es la pendiente.
- Para el análisis de western blot, se utilizaron 25 μ g de proteína total, para cada muestra.

Western blot.

El nivel de distintos biomarcadores fue evaluado por western blot. Los pulmones de ratones WT y mutantes MMP8-MMP13 se homogenizaron en buffer RIPA. La concentración de proteína se cuantificó mediante la técnica de ácido bicinonínico (Kit de ensayo de proteína BCA, Pierce Biotechnology). Se utilizaron 25 μ g de proteína de cada muestra y se corrieron en geles de SDS-poliacrilamida al 8% o 13%. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore), y a continuación, las membranas se bloquearon con leche a 5% sin grasa y se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos. Después de tres lavados con PBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente y se revelaron por quimioluminiscencia con el reactivo Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore).

Análisis estadístico.

Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron mediante ANOVA de un factor seguido por la prueba de Tukey. El score de fibrosis se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar. El valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO.

Con el objetivo de corroborar el genotipo de los ratones derivados de cruces directos (WT X WT, dKO X dKO) se realizaron PCRs con primers específicos para identificar tanto a los alelos MMP8 y MMP13 WT, como a los alelos mutantes. Para el gen *Mmp8* se utilizaron 3 primers: HT dirigido a una región del **intrón 1**; KO, dirigido a una región del gen de resistencia a neomicina insertado en el exón 2; y WT, dirigido a una región del **intrón 2**. Al correr los productos de la PCR en un gel de agarosa se pueden observar dos bandas, una de 909pb correspondiente al alelo WT y otra de 529pb correspondiente al alelo mutante (Fig. 12).

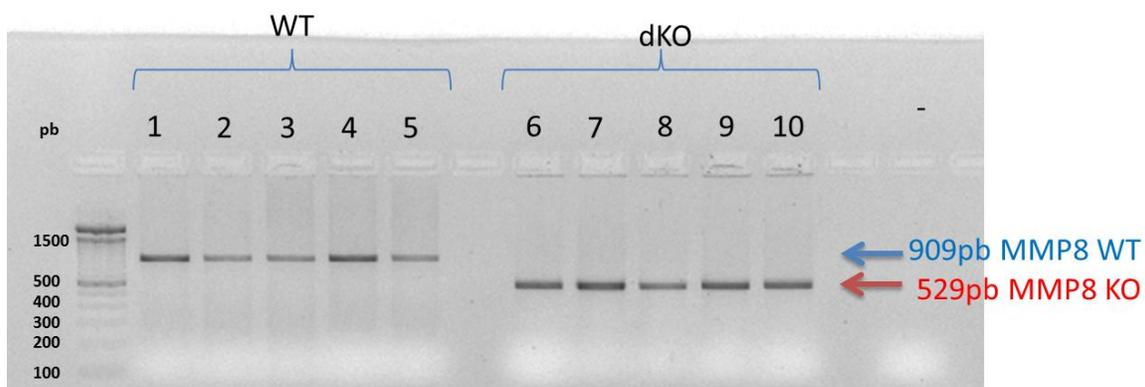


Figura 12. Análisis del genotipo para el gen *Mmp8*. Imagen representativa de una electroforesis de un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. La imagen está en negativo. En el carril 0 está el marcador de pesos moleculares de 100 pb; en los carriles 1 a 5, se encuentran muestras de 5 individuos WT, mientras que del carril 6 al 10, se encuentran 5 individuos dKO. Podemos observar la correlación de los productos correspondientes a alelos WT en los primeros 5 carriles y los productos correspondientes a los alelos KO en los últimos 5 carriles.

Usando el software <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (nucleotide blast), se mapearon los primers en el alelo WT para corroborar el tamaño del producto de amplificación de *Mmp8* (Tabla 1).

Mmp8

Forward Primer MMP-8 HT F4 sequence 5' – ATG TTC TAT GGC GTT GTT CTT TCA -3

Reverse Primer 1 MMP-8 WT R3 sequence 5'- CAG GGC TAG GTT TTC TTC AGC A -3'

Reverse Primer 2 MMP-8 KO R5 sequence 5'- GGA CAG CAA GGG GGA GGA T- 3'

Tabla 1. Secuencia del gen *Mmp8*. Se muestran los exones en color azul, los intrones en negro y la ubicación de los primers en amarillo.

```

1 atgtttcgcc tgaagacact tccattactg atcttctctc acacacagct tgccaatgcc
61 ttcccagtac ctgaacacct ggaagagaaa aatataaaaa ctgctgaggt aatgggctg
121 tctatcacag ttgatttgcc ggtgggtaca gaattctgag ggtggctttc ccttcttagt
181 ctagaaggac agaagagat tcttcgcatg ggtttgcaa ggctcagcat cactttctga
241 gacttgaaa actccacgtg gtcaaggcct ggccctggaa aatgtagaca tgaagacagc
301 tgggtgtttt caagccaag gaacactact gtcaggccag ctgcagctgg agccttttca
361 gagagaatat tttatttata aaatgaactg agttgcctac ctaatttttt ctcttcagt
421 atacctgtaa cccagttggt ccacgctcta taggccagtg cttagtgatg agaatacttg
481 ctggtatccc aacactaaaa aaatggtggg ggctgtgggg aggtcaaatt atgacctgcc
541 caccgcttcc tgtatggata gttttctgca gccaaaaata ctttcatata gagacgatag
601 atggaaatgg ggggttataa ttaattaaaa ttaacacatt gttaatcaga ttttccagga
661 ctgtttatta aactttggaa gtttagcatc tctctgtgtt tatagtataa aaaaaggcca
721 cttttttatg caagagaatg taatcaccaa tttctgtgtc atagttttct tagtattgaa
781 atttccggaa agcataattc ttgctctttt ctgcgaatca tttttgtgcc tggcacagaa
841 gccctaagt tcgtactgag ggtgggctgg gttcactttg caggtgccac tcctctaagt
901 atcacaatga ctgtgatgtt ggagacaaaag aacagtgctg ggatttgccc acacctgcca
961 catctcaaag tgcaagctct gctctctgtc acctccaaat aaccaggtag tcacatacga
1021 agcacagtat atatacatag gctacacatg gcaaggtaaa gagaccttac cattgactgg
1081 catgtcaaca cttgtgaatg agagtggcctt acaagatcct atctgggtaa atgaaatgct
1141 gctgttgccc caaacatctt ttaaatgacc agttctcatt tgaaagccat tgcagtaagc
1201 caggacctgt actgtcacct tcccttgggt tcttgaacct tccatttctc tgtgagggtg
1261 attaaacctt ctctccattt agtgaagaaa tttttaagca gaaaagtcct catttttata
1321 actaacactt caacagatat aaaaacaata gttaaagcc agtactgatt aaaacaaaag
1381 ccatgctgcg gactgtatag tagcggacta tatagtagag gactgtatag tagcgggctg
1441 tatagtagtg gactgtatag tagcagttgg tgtgtgactt ggattcattc ctcccctggt
1501 gtaagacttt tgttttttat tcaaaaatcc atgagatctc agggaaatgca gagaatgttc
1561 tatggcgctg ttctttcaaa atcaatctac aagttatfff aattaagtga atttcttttc
1621 gtgagtgtgg gagggaaatg catgccacag tgcacatatg gtaatcagaa cacagtaaac
1681 ttggaagaaa gagtcagctc tctccttcta ctgtgtgggt ggtgaggtea atcttagcct
1741 gtcaggcttg acccactgag ctatcccttc ccacaatttc tgttattgtc ccttgccctg
1801 cgggtcctgy tttacattct gtggcaactt agaaaagaatt gcaaaatgtc cggagcaatt
1861 tcacagcaag tactctggtg tgtttatfff gatcagaatt acctaogaaa attctacaac
1921 ttaccaagca atcaattcog gtcttcgagg aatgccacga tggttgcaga gaagcttaaa
1981 gagatgcagc gcttcttcag cttagcagag actgggaagt tagatgcagc tacaatgggg
2041 attatggaaa tgcctcgatg tggagtgcct gactctgggt atttcttget aaccccagga
2101 agtcccaagt ggacacacac taacctgacc tacaggtgac attcctagag tctggggatt
2161 catccactca gctagtgagt gacagctctg gacacctcag acattgttgc agaacttggg
2221 agccactata gaccaatgaa cagatatoct gcccttacca aatttggag agtagaatgt
2281 gagctggaag ctagcttgag gctgagaaaag cagagagccc ggggttcttt caaccctaca
2341 gcttaccacg ttgagtctct tcagcaatct aaaaagacta tgccatcatg agactgtctc
2401 ttctagtcag ttacttttaa gtacaaaaga ggcttaacca ttgctgaaga aaacctagcc
2461 ctgttctgta tatcttggtg acacagtaa taatactcac tttctgtgta gtataatggt
2521 taaccacaaa actaacagct tacagtgtat ttaatttctc cagctaccta taaggcagat
2581 cttactgtat catcatcatc ttatggacag ggacaccaag gcttaaagac aagtagttac
2641 ttgtccagac tccagctgtg cttcagccct gagacataca cccctcctga tgetctgtcc
2701 aagtagtagt gcattacata agtaacgtac tccaaaatag agtgactgtg tagttcaaag
2761 ggggtgctaa taatagcaaa ccattcttac tcttctcat tttcaaggga ttataaacca

```

```

2821 tacgccacag ctgtcaaggg ctgaagtga aacagcaatt gagaagcctt ttcaggtctg
2881 gagtgtagca tcgcccctga ccttcaccga gatcttacag ggagaagcag acatcaacat
2941 tgctttcgtc tcaagagta

```

Para el caso del gen *Mmp13* se utilizaron dos primers, dirigidos hacia una región interna de la secuencia del gen de resistencia a higromicina (Hyg) y a la secuencia del gen *Mmp13*. Al correr los productos de la PCR en un gel de agarosa se observaron dos bandas. Una de ellas con el tamaño esperado de 196pb y otra de aproximadamente 500pb. Con la finalidad de corroborar que el producto de 196pb correspondiera a la secuencia del gen Hyg y para saber a qué correspondía el producto de 500pb se purificó el ADN y se mandó a secuenciar al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

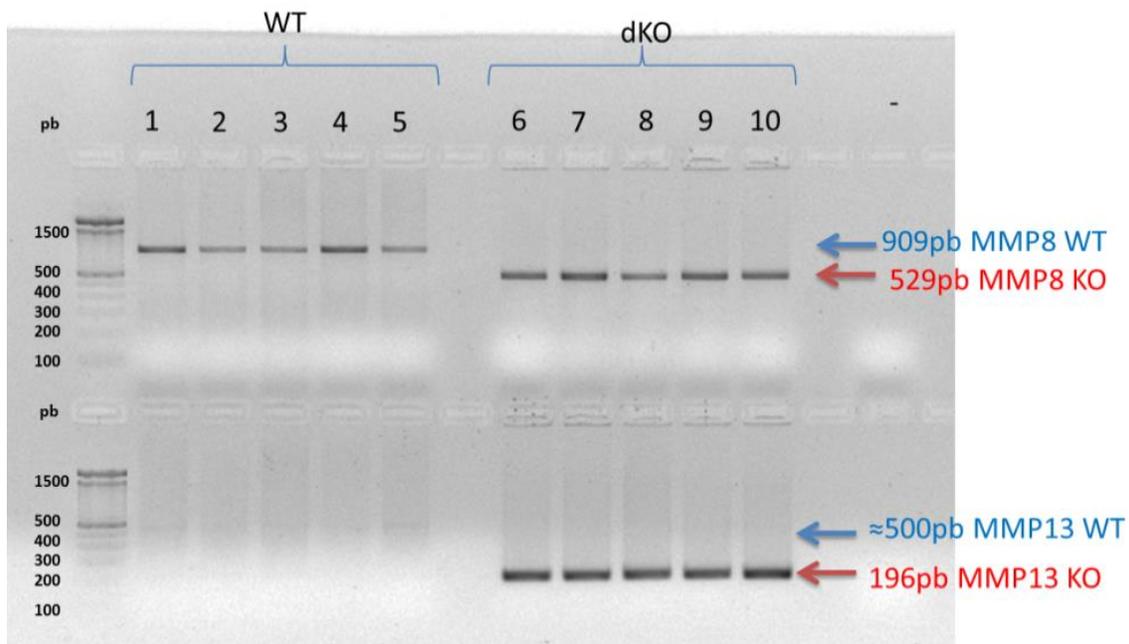


Figura 13. Análisis del genotipo para el gen *Mmp13*. Imagen representativa de una electroforesis de un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. La imagen está en negativo. En el carril 0 está el marcador de pesos moleculares de 100 pb; en el carril 1 a 5, se encuentran muestras de 5 individuos WT, mientras que del carril 6 al 10, se encuentran 5 individuos dKO. Podemos observar la correlación de los productos correspondientes a alelos WT en los primeros 5 carriles y los productos correspondientes a los alelos KO en los últimos 5 carriles, corroborando el genotipo de los individuos dKO.

En la figura 13 se observa que el genotipo *Mmp8* KO en los individuos del carril 6 a 10, en el gel superior, coincide con el genotipo *Mmp13* KO en los mismos individuos del gel inferior. Estos resultados sugieren que los individuos del carril 6 al 10 tienen un genotipo doble mutante, ya que están portando el gen de resistencia a neomicina (*Mmp8*) y el gen de resistencia a higromicina (*Mmp13*).

SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A HIGROMICINA.

Con objeto de confirmar si el producto de amplificación correspondía con la secuencia del gen de resistencia a higromicina el producto de PCR se purificó y se envió a secuenciar. Posteriormente la secuencia fue analizada con el software BLAST.

D) Las secuencias que se obtuvieron son las siguientes:

Hyg Forward

nnnnnnanntgtcagcacttccggatcgggagcgcggccgatgcaaagtgccgataaacataacgatcttttagaaaccatc
ggcgcagctatttaccgcaggacatatccacgccctctacatcgaagctgaaagcacgagattctcgcctccgagaan

Hyg Reverse

nnnnnnnnnantanagggcgtggatgtcctgcgggtaaataagctgcgccgatggttctacaagatcgttatgtttatcggcac
ttgcatcggccgcgctcccattccggaagtgcttgacattggggaattcagcgagagcctgacctattgcatctcccgcaa

Hyg WT Forward

nnnnnnnnnnnggctctctatccagagagtgttcctgaggactataacagagccttgatgggcaccactgcctctgagc
ctctgggctccagcgttcggataggtagccataccgatgccccgagccaccactgattttagccctccatactcccacaggagta
gaagcctgagctcttacagaccctctgagcctctgctgtttgacccaaaccctagagagccatctcaccacaacacataggaa
gcaagaaccaggtgcacctcaggccagagatcaaccagcacaggtggcagggcagggcatacctactgtctacaggtgccagcc
gttctctagcaactggaaaaaggaatcaccggctctgtacagtgcacctggcttagagaccacattgtcccaccaaggagagg
ggagcaggtgtatcctactgagaatatcaagtttaaccgcttagaggaggagcagttctgggagattctcennctccgagaant
nctctcnctaagcggntataacttgatattctcagtaggatacacctgctcccctctccttgggtgggaacaatnggtctctagacc
aggtgtcactgttcaagagccgngattcctttccagttgctaggaaacggctggnnctgtagacgtagnatgccctgccngccn
ctgtgctggtgatctctggctgngngccctggnctnngctttctattgngn

WT R Reverse

Nnnnnnnnagcggtagacttgatattctcagtaggatacacctgctcccctctccttgggtgggaacaatgtggtctctagacca
gggtgactgtacaagaccgggtattcctttccagttgctaggaaacggctggcacctgtagacagtaggtatgccctgctgcc
acctgtgctggtgatctctggcctgaggtgcacctggttcttctctatgttggggatgagatggctctctagggttggggtcaa
aacaggcagaggctcagaggggtctgtaagagctcaggcttctactcctgtgggagatggagggctaaaatcagtggtggctcg
gggcatcgggtatggctacctatccgaagcgtggagcccagaggctcaggaggcagtggtgcccataaggtctgttataag
tctcagggaacactctctggatagagaggccaaccctagaaactactgggattgacctattgnnctcccgcancn

- II) Las secuencias fueron alineadas utilizando Mega6 (ClustalW) y estas fueron las secuencias idénticas que se obtuvieron:

Hyg KO:

```
tgtcaagcacttccggaatcgggagcgcggccgatgcaaagtgccgataaacataacgatctttgtagaaacc  
atcggcgcagctatcttaccgcaggacatatccacgcct
```

Hyg WT:

```
ctctctatccagagagtgttccctgaggacttataacagagccttgatgggaccccactgcctcctgagcctc  
tgggctccagcgccttcggataggtagccataaccgatgccccgagccaccactgattttagccctccatactc  
ccacaggagtagaagcctgagctcttacagacccctctgagcctctgcctgTTTTgaccccaaaccctagaga  
gccatctcaccccaacacataggaagcaagaaccagggtgcacctcaggccagagatcaaccagcacagggtggc  
aggcagggcatacctactgtctacaggtgccagccgTTTTcctagcaactggaaaaaggaatcaccggctcttg  
tacagtgcacacctggtctagagaccacattgttcccacccaaggagagggggagcagggtgtatcctactgagaa  
tatcaagt
```

- III) Al realizar el análisis en BLAST de las secuencias alineadas correspondientes a *Hyg KO*, se obtuvo un 100% de identidad para las 113 bases de la secuencia con diversos vectores de clonación que contienen al gen. Y un 100% de identidad para la secuencia obtenida de ambos primers.
- IV) En el caso de la secuencia correspondiente a *Hyg WT*, se obtuvo un 98% de identidad para la secuencia alineada de 446 bases nitrogenadas con un único segmento del cromosoma uno de *Mus musculus*, correspondiente a una región de un gen predicho Gm 16152.

De lo anterior se concluye que el producto de 196pb obtenido por PCR utilizando los primers que diseñé para detectar una región del gen Hyg posee la secuencia esperada y por tanto corresponde al gen de resistencia, insertado en el gen que codifica a la Mmp13, para interrumpir su expresión.

EXPRESIÓN DE MMP8 Y MMP13 EN EL PULMÓN DE RATONES WT Y MMP8-MMP13 DKO EN EL PULMÓN EN CONDICIONES BASALES.

Para corroborar que los ratones con genotipos MMP8-MMP13 dKO no presentaran expresión de estos dos genes se realizó síntesis de cDNA a partir de extractos totales de RNA del pulmón de ratones silvestres y doble mutantes. El cDNA fue utilizado para evaluar la expresión de distintas Mmps y Timps, utilizando sondas TaqMan específicas. Como se muestra en la figura, la expresión de *Mmp8* y de *Mmp13* se encuentra abatida en el doble mutante, como se esperaba. En el pulmón del ratón WT, observamos la expresión de ambas colagenasas, sin embargo, es importante resaltar que la expresión de *Mmp13*, en comparación con *Mmp8*, es mayor (Fig. 14).

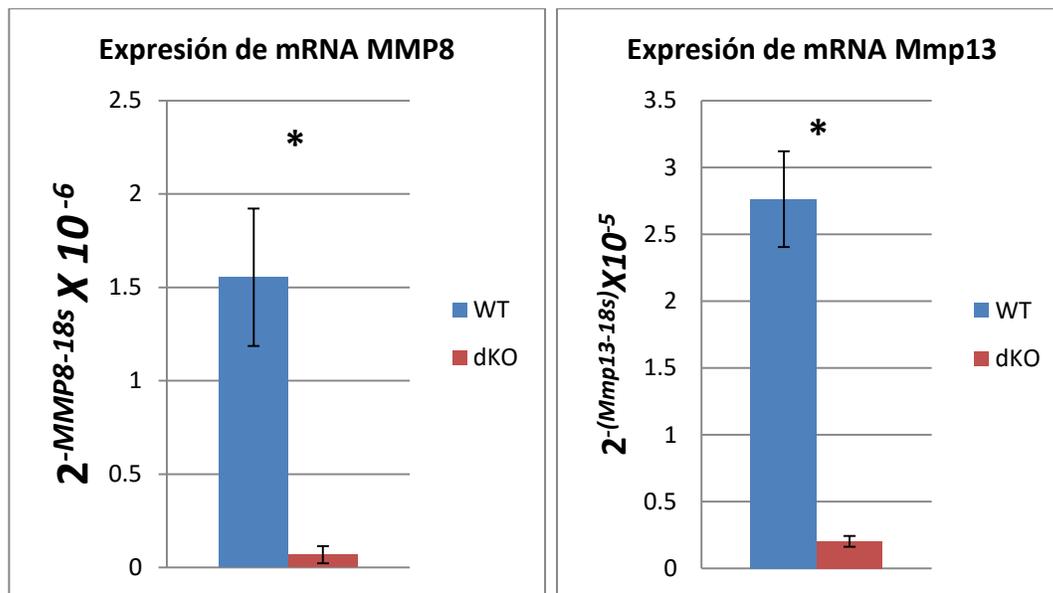


Figura 14. Niveles de expresión genica ($2^{-\Delta ct}$) de los genes *Mmp8* y *Mmp13* comparando muestras de tejido pulmonar de ratones WT VS dKO MMP8-MMP13. Se observa un abatimiento de la expresión de estos genes en los ratones dKO MMP8-MMP13 y una expresión basal en los ratones silvestres. El RNA total de pulmón se obtuvo usando Trizol (Life Technologies, NY), de acuerdo al protocolo del fabricante. Este RNA se utilizó para la síntesis de cDNA, utilizando el kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen). Se evaluó la expresión de los genes *Mmp8* y *Mmp13* y RNA18s, mediante qPCR utilizando sondas TaqMan y el kit para qPCR TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Invitrogen). N=6, p <0.05.

HISTOLOGÍA DEL PULMÓN.

Condiciones basales.

Para evaluar si la deficiencia de las enzimas MMP8 y MMP13 alteraba la morfología del pulmón, inicialmente evaluamos la histología del pulmón de ratones MMP8-MMP13 doble mutantes, en condiciones basales y comparamos con la histología pulmonar de ratones WT o silvestres. El análisis morfológico del pulmón de ratones MMP8-MMP13 mutantes en condiciones basales no reveló diferencias, al comparar con los pulmones de los animales de tipo silvestre o WT (**Fig. 15 y Fig. 21A y B**). Se evaluaron por lo menos 3 campos distintos en 6 ratones distintos por cada genotipo. Todas las observaciones derivadas del análisis histológico en esta tesis fueron avaladas por el patólogo Miguel Gaxiola Gaxiola.

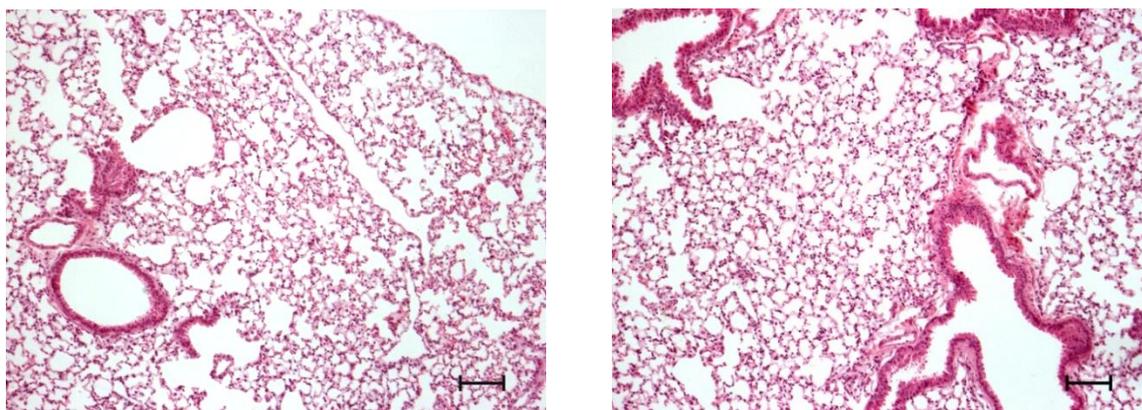


Figura 15. Histología de pulmón WT (Izq) y MMP8-MMP13 dKO (Der) en condiciones basales con tinción con Hematoxilina-Eosina. 10x, escala: 100µm.

Análisis histológico durante el daño pulmonar inducido por bleomicina.

Posteriormente, evaluamos el daño pulmonar en el ratón doble deficiente MMP8-MMP13, utilizando el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina como se indica en métodos. El análisis histopatológico reveló que el tratamiento con bleomicina indujo una inflamación intersticial multifocal e intra-alveolar y la respuesta inflamatoria estuvo caracterizada por infiltración de neutrófilos a los 7 días post-tratamiento. Sin embargo, la respuesta inflamatoria en el doble deficiente MMP8-MMP13 fue significativamente mayor en comparación con el WT, y estuvo caracterizada por acumulación de leucocitos en zonas cerca del endotelio o de bronquios, como se muestra en las figuras 16, 17 y 21C-D.

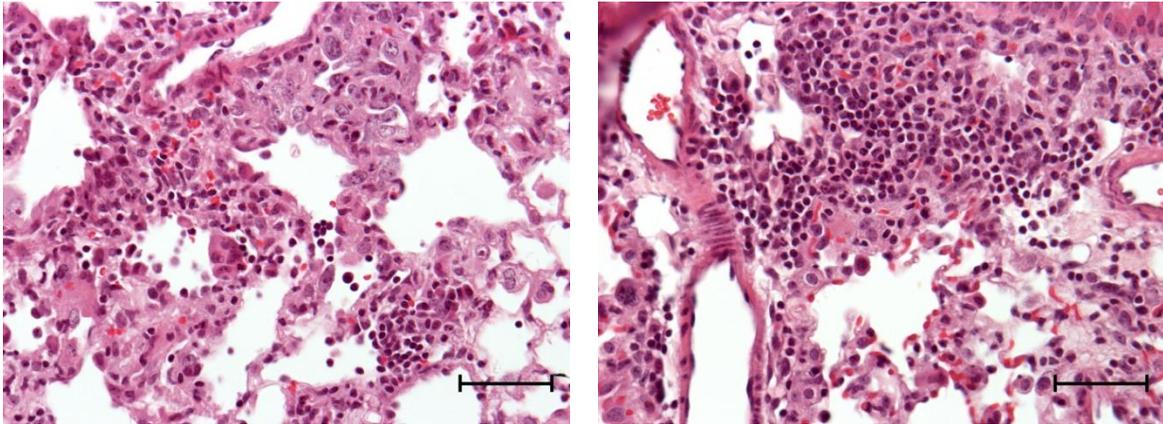


Figura 16. Histología de pulmón WT (Izq) y MMP8-MMP13 dKO (Der), 7 días post instilación de bleomicina con tinción con Hematoxilina-Eosina. 40x, escala: 50µm.

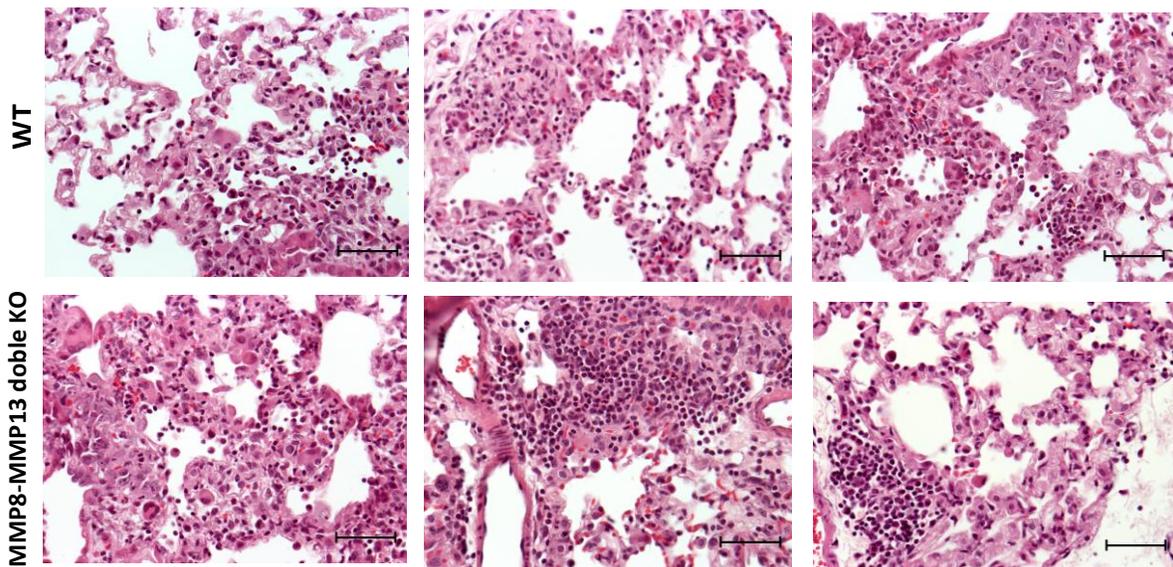


Figura 17. Histología de pulmón en el período de 7 días, etapa inflamatoria. Se muestra que en los ratones WT hay un menor infiltrado de células inflamatorias en el panel superior. En el panel inferior, se muestra que en los ratones MMP8-MMP13 dKO hay mayor infiltrado de células inflamatorias, tinción con Hematoxilina-Eosina. 40x, escala: 50µm.

A los 28 días después de la instilación de bleomicina, tanto los ratones silvestres como los mutantes desarrollaron fibrosis, caracterizada por acumulación de fibras de colágena, engrosamiento de la MEC y gran cantidad de fibroblastos intersticiales evaluado por tinción con HE. Sin embargo, los ratones doble deficientes MMP8-MMP13 exhibieron una fibrosis más extensa y severa, caracterizada por una densa acumulación de colágena fibrilar en el parénquima pulmonar, evaluada por tinción de tricrómica de Masson (**Fig. 18, 19, 21E-F**).

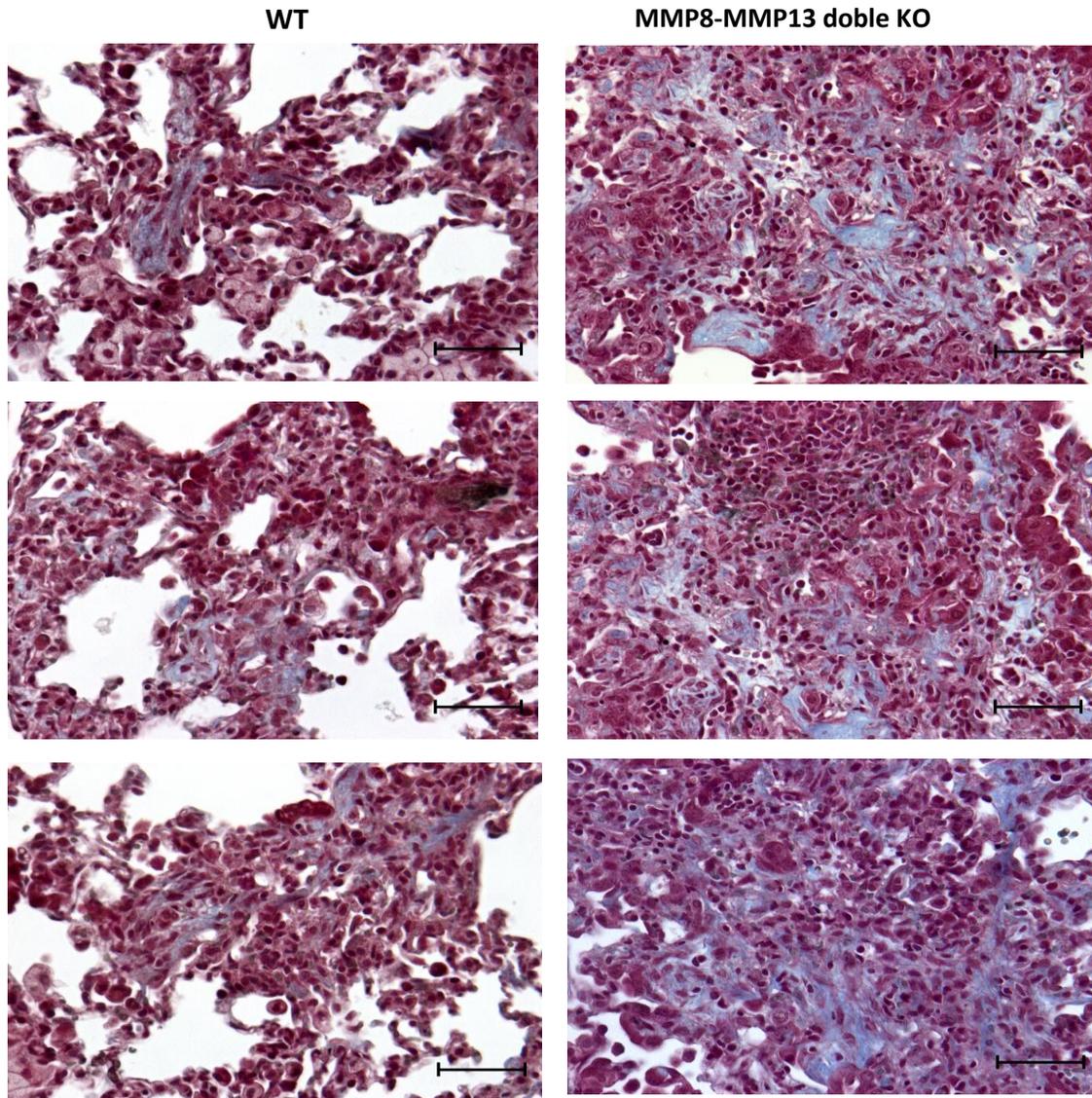


Figura 18. Histología de pulmón en el período de 28 días, etapa fibrosante. Se muestra que en los ratones WT hay un menor depósito de MEC (fibras azul turquesa) en el panel de la izquierda. En el panel de la izquierda se muestra que en los ratones MMP8-MMP13 dKO hay mayor depósito de MEC y mayor extensión del daño, tinción Tricrómica de Masson, 40x, escala: 50 μ m.

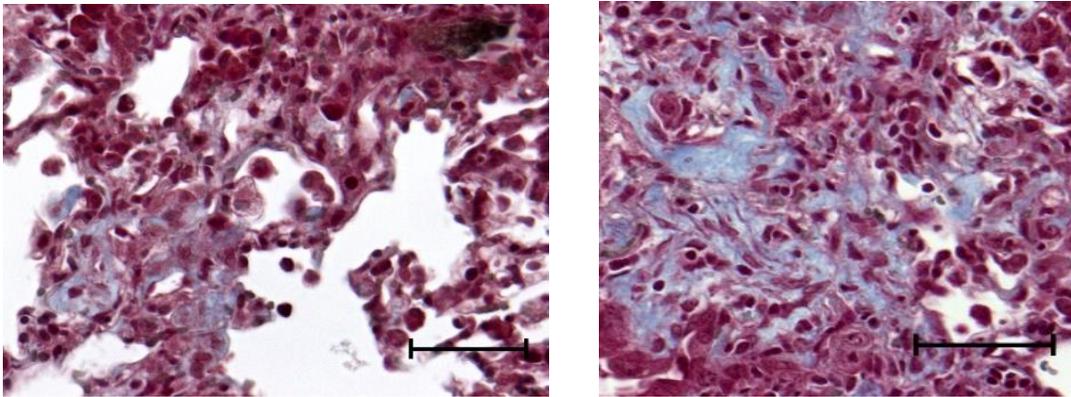


Figura 19. Histología de pulmón WT (Izq) y MMP8/MMP13 dKO (Der), 28 días post instilación de bleomicina. Imagen representativa del pulmón fibrótico de un ratón silvestre o WT (izquierda) y un ratón mutante doble deficiente de las enzimas MMP8 y MMP13 (derecha). Tinción tricrómica de Masson, en azul turquesa se visualizan las fibras de colágena en el tejido. 40x, escala 50 μ m.

La respuesta fibrosante tan severa, desarrollada por los ratones doble deficientes, nos llevó a plantearnos varias preguntas: ¿Habrà progresión de la fibrosis en los MMP8-MMP13 dKO después de los 28 días post-instilación?, ¿El tiempo de resolución en los doble mutantes será similar al período descrito en la literatura para los ratones WT (después de la 4 semana post-instilación)?; para responder a estas preguntas, sacrificamos a los ratones 42 días después del daño inducido con bleomicina.

El análisis del pulmón derivado de los ratones WT a los 42 días post-instilación de bleomicina, muestra una gran extensión del tejido epitelial con una histología normal, sin embargo en algunos casos se observaron áreas con pequeños y escasos focos de fibrosis. En cambio, al analizar el tejido de pulmón del ratón MMP8-MMP13 dKO se observa un epitelio anormal, principalmente cuboidalizado, con una MEC engrosada en el espacio intersticial y con infiltrado de fibroblastos. En comparación con el análisis histológico de 28 días, observamos que en el ratón silvestre hubo una resolución importante de la fibrosis, aunque en algunos casos no fue total, ya que como mencioné previamente, en algunos ratones WT todavía se pueden observar pequeños focos de fibrosis (**Fig. 20 y 21G**). En el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 dKO, aunque también se observa que el depósito de MEC ha disminuido, el engrosamiento del espacio intersticial es mayor en comparación con lo que observamos en el WT. Estos datos indican que aunque hay cierto grado de resolución de la fibrosis en el pulmón del ratón MMP8-MMP13 dKO, ésta es parcial, por lo

tanto la ausencia de las enzimas MMP8 y MMP13 resultan en un retardo en la regresión de la fibrosis (**Fig. 20 y 21H**).

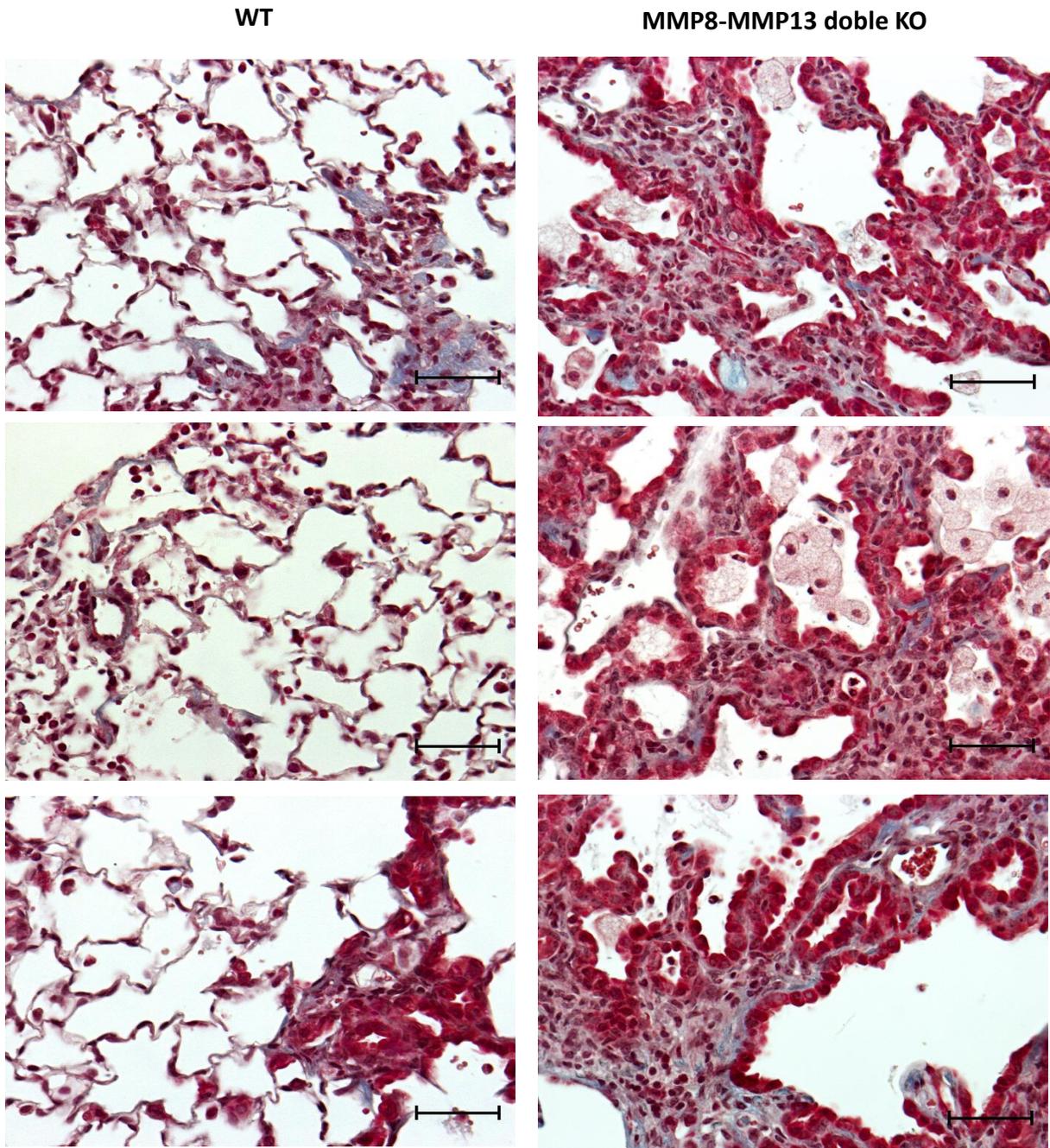


Figura 20. Histología de pulmón WT (Izq) y MMP8-MMP13 dKO (Der) en etapa de resolución de la FP. Imagen representativa de resolución de fibrosis pulmonar (42 días post-institilación de bleomicina) de tres ratones silvestres o WT (izquierda) y tres ratones mutantes doble deficientes de las enzimas MMP8 y MMP13 (derecha). Tinción tricrómica de Masson, en azul se visualizan las fibras de colágena en el tejido. 40x, escala 50 μ m.

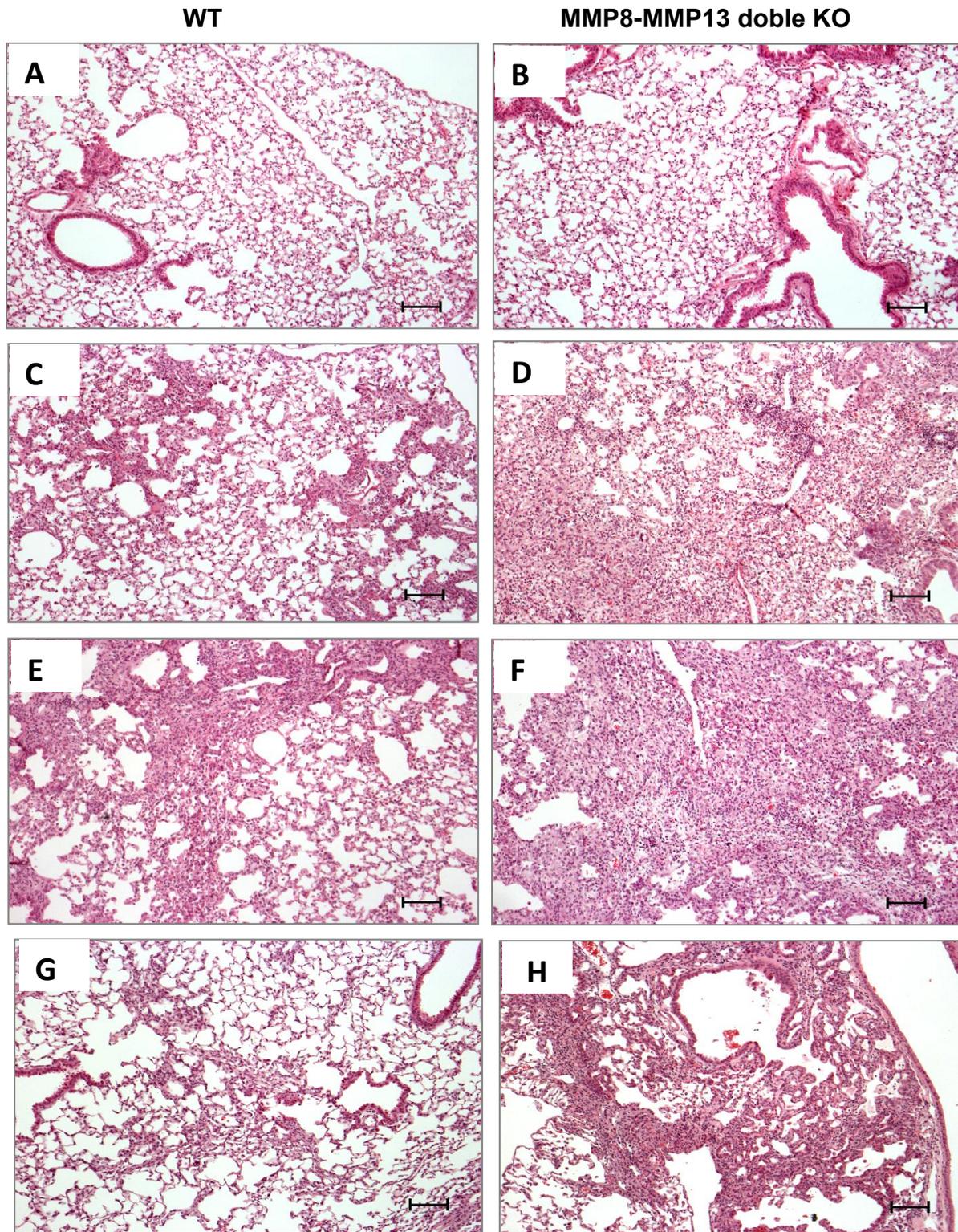


Figura 21. Curso temporal del modelo de fibrosis pulmonar. A, C, E, G, corresponden a individuos WT control solución salina, y 7, 28 y 42 post-instilación con bleomicina respectivamente. B, D, F, H, corresponden a individuos MMP8-MMP13 dKO control solución salina, y 7, 28 y 42 post-instilación con bleomicina respectivamente. Tinción hematoxilina-eosina, escala 100µm.

Evaluación semicuantitativa del índice clínico.

Cómo una manera de obtener una evaluación semicuantitativa del análisis histológico, las muestras fueron evaluadas por el patólogo del INER para obtener el score de fibrosis o índice clínico, de acuerdo a una escala donde: fibrosis grado 3 es considerada como severa o grave, grado 2 como moderada, grado 1 como mínima o leve, y grado 0 como control o sin cambios histológicos. El resultado derivado del índice clínico muestra una fibrosis más severa en los ratones MMP8-MMP13 dKO, en comparación con su contraparte WT, en un período de 28 días post-instilación, así como un mayor daño en la etapa de resolución (42 días post-intilación) (**Fig 22**).

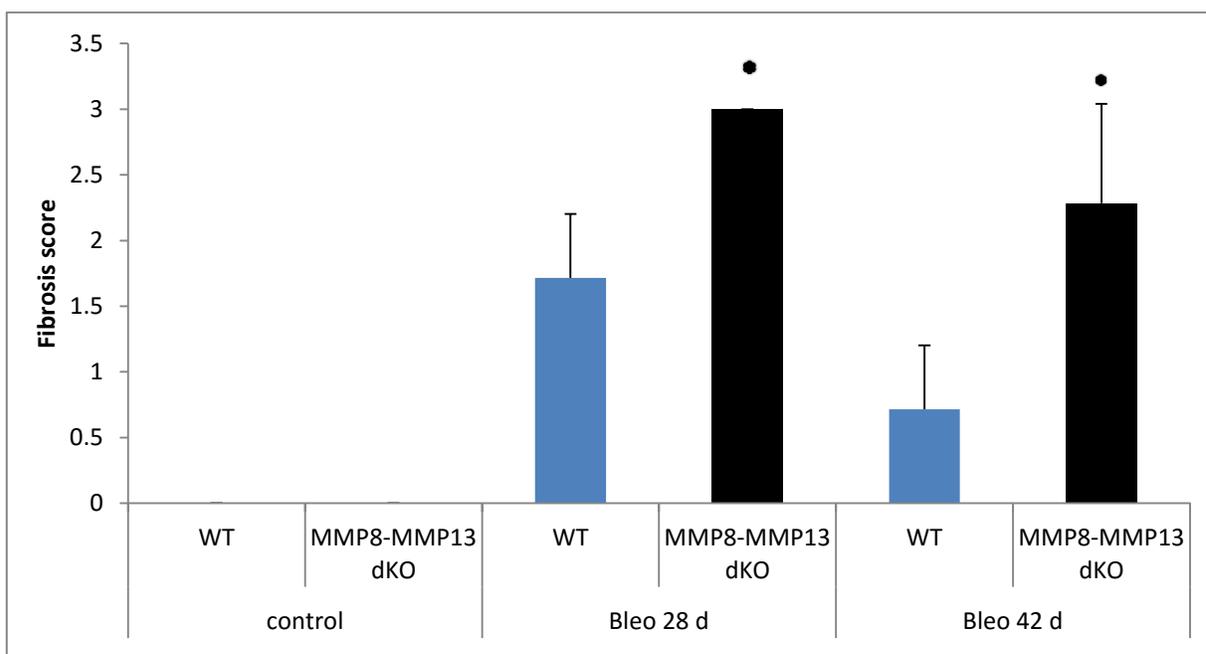


Figura 22. Score de fibrosis en condiciones basales (control), etapa fibrosante (28 d) y resolución (42 d). n=6, $p \leq 0.05$.

CUANTIFICACIÓN DE HIDROXIPROLINA.

Se realizó la cuantificación de hidroxiprolina en diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad (controles solución salina, 28 y 42 días post-bleomicina), con el fin de tener una medida cuantitativa de la acumulación de colágena. No se encontraron diferencias en el contenido de hidroxiprolina en condiciones basales, entre los pulmones derivados de ratones WT y MMP8-MMP13 dKO, aunque estos últimos mostraron un promedio ligeramente mayor ($56.25 \pm 2.88 \mu\text{g}$ vs $64.58 \pm 4.4 \mu\text{g}$). El tratamiento con bleomicina indujo un aumento en el nivel de hidroxiprolina tanto en los ratones WT ($167.07 \pm 14.07 \mu\text{g}$), como en los ratones doble deficientes MMP8-MMP13 ($346.26 \pm 11.66 \mu\text{g}$), sin embargo, la cantidad de hidroxiprolina aumentó casi 2 veces más en los ratones MMP8-MMP13 dKO, en comparación con el nivel de hidroxiprolina en el pulmón de los ratones WT.

El nivel de hidroxiprolina en los pulmones de ratones WT disminuyó significativamente, alcanzando casi los valores basales ($82.93 \pm 2.27 \mu\text{g}$) a los 42 días post-institución de bleomicina. En los ratones doble deficientes MMP8-MMP13 el contenido de hidroxiprolina también disminuyó en comparación con el nivel observado a los 28 días ($250 \pm 4.52 \mu\text{g}$), sin embargo, es dos veces mayor que el nivel encontrado en los WT, en este período de tiempo (**Fig 23**).

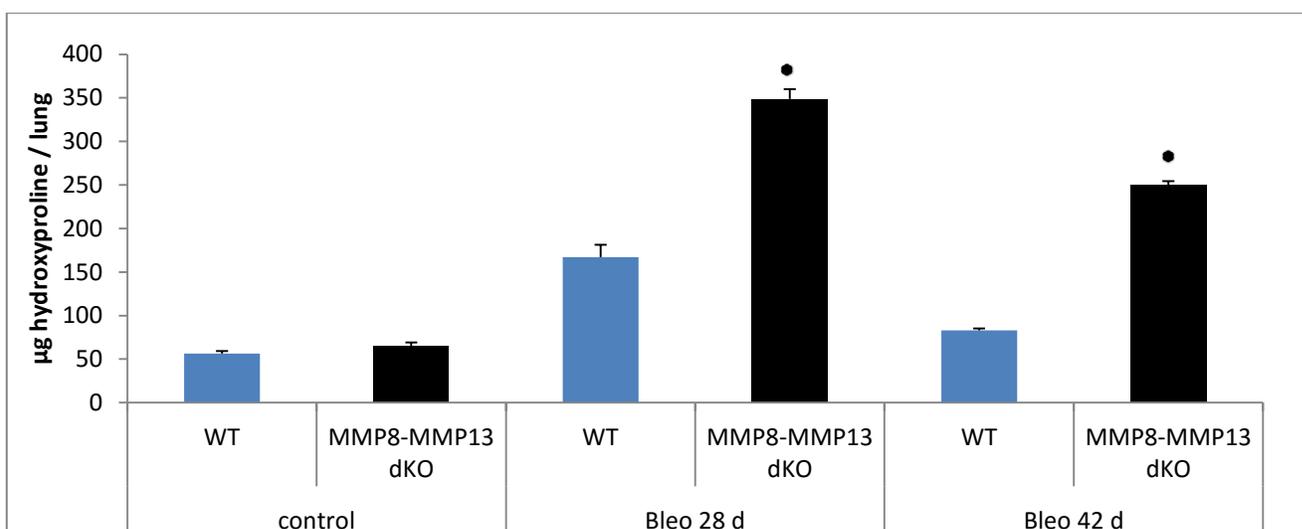


Figura 23. Determinación de µg de hidroxiprolina en condiciones basales (control), etapa fibrosante (28 d) y resolución (42 d). n=6, p<0.05.

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *MCOLA*, *MMP2*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP7*, *MMP13*, *MMP14*, *TIMP1*, *TIMP3*, *LOX1*, *COL1A1*, *COL13A1* A NIVEL DE mRNA.

Para evaluar si ocurrían cambios en la expresión de otras MMPs, se evaluó la expresión de *Mcola*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp7* y *Mmp14*. Además se evaluó la expresión de *Mmp8* y *Mmp13*. También se evaluó la expresión de inhibidores de MMPs, *Timp1* y *Timp3*, la expresión de *Colla1* y *Col13a1*, y la expresión de *LOX1*, enzima involucrada en el entrecruzamiento de fibras de colágena. La expresión del gen *RNA18s* fue evaluada como gen endógeno para la normalización, como se describe en los métodos, se realizó la extracción de ARN de tejido pulmonar de ratones WT y MMP8-13 dKO en condiciones basales, y de pulmón derivado de ratones sacrificados a los 28 y 42 días post-institución con bleomicina. La concentración de ARN total se examinó en cada muestra mediante espectrometría usando el espectrómetro NanoDrop 2000, analizando la relación de absorbancia 260/280nm. De igual manera, la calidad del ARN se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% para analizar las bandas correspondientes al RNAr 18s y 28s (**Fig. 24**) y desechar las muestras en las que se observara degradación del RNA total. El RNA total fue usado como molde para la síntesis de cDNA, para evaluar la expresión de los genes antes mencionados, usando sondas TaqMan específicas. Se seleccionaron 3 muestras de pulmón de ratones WT y 3 de pulmón de ratones doble deficientes, con una calidad óptima del RNA, para la síntesis de cDNA.

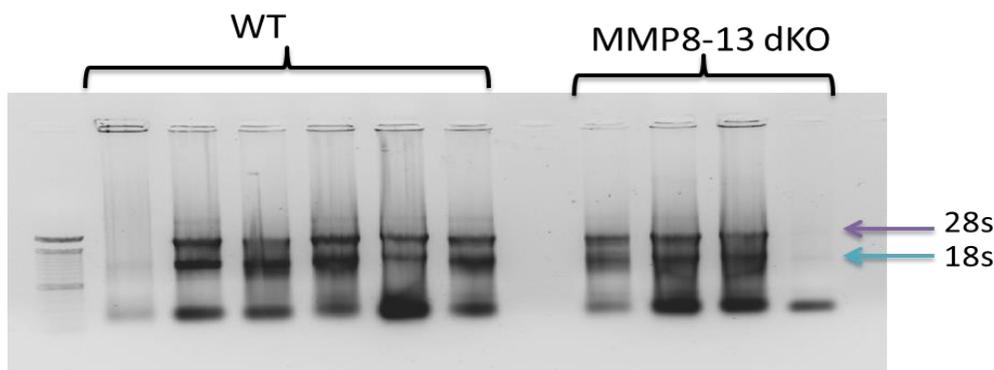
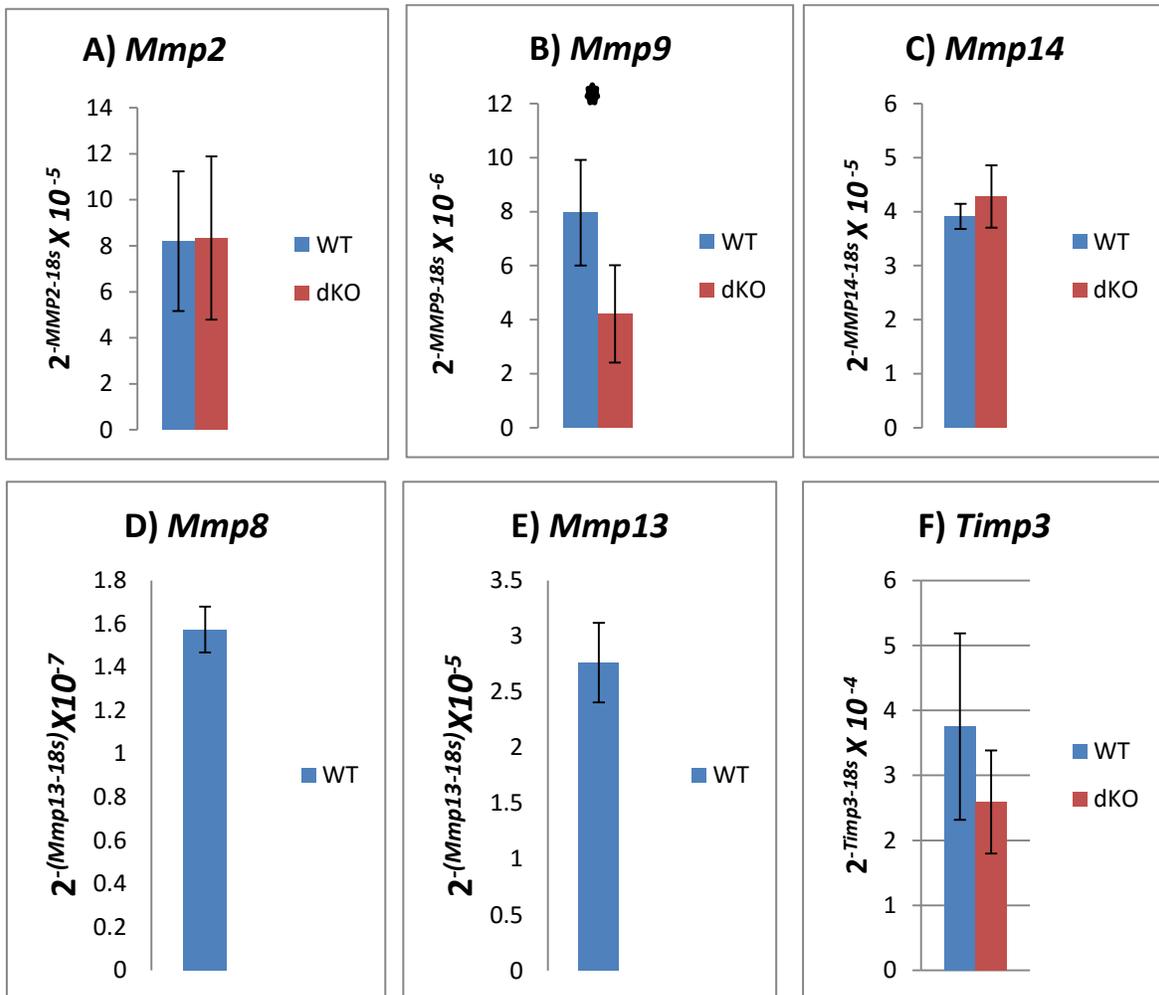


Figura 24. Análisis de la calidad de ARN. Los carriles 2 a 7 contienen muestras de ARN de ratones WT, mientras que los carriles 8 a 11 poseen muestras de ARN de ratones MMP8-13dKO. Se puede observar que no hay degradación del ARNr, existiendo claramente las bandas correspondientes al ARNr 28s y 18s.

Condiciones basales.

En condiciones basales, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes *Mmp2*, *Mmp14*, *Timp1*, *Timp3*, *Coll1a1*, *Col3a1* y *Lox1*. Tanto en los ratones WT como en los MMP8-MMP13 dKO, no se observó expresión del gen *McolA*, lo que era de esperarse pues su expresión solo se ha reportado durante el desarrollo embrionario, o en etapa adulta, en ciertas condiciones patológicas. De igual manera, no se observó expresión del gen *Mmp7* en ningún caso. Únicamente la expresión de *Mmp9* se observó disminuida significativamente en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 dKO al compararlos con los ratones WT en condiciones basales (**Figura 25B**). La expresión de *Timp1* se observó significativamente aumentada en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 dKO al compararlos con los ratones WT (**Fig. 25J**)



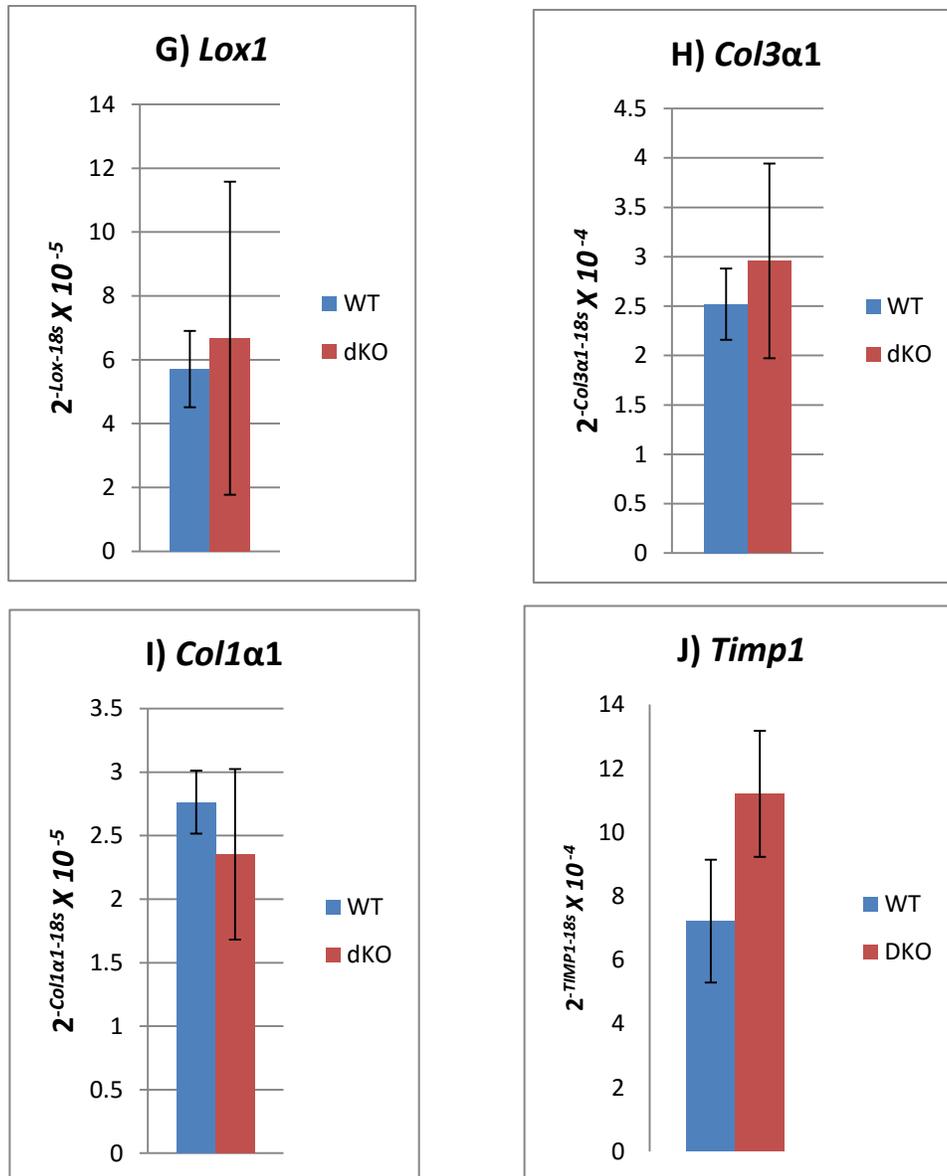


Figura 25. Niveles de expresión génica ($2^{-\Delta Ct}$) en pulmón de ratones WT vs MMP8-MMP13 dKO en condiciones basales, n=6, $p \leq 0.05$.

Etapa fibrosante.

Durante la etapa fibrosante (28 días post instilación de bleomicina) se analizó la expresión de los genes *Mcol A*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp7*, *Mmp8*, *Mmp13*, *Mmp14*, *Timp1*, *Timp3*, *Lox1*, *Colla1* y *RNA18s*. Sólo se encontró un aumento en la expresión del gen *Colla1* y en la *Mmp14* en los ratones doble deficientes, al compararlos con su contraparte silvestre, en la etapa fibrosante (**Fig. 25C y F**). Se sabe que la MMP14 o MT1-MMP es una colagenasa pericelular potente, por lo tanto, se puede postular que podría estar compensando, al menos parcialmente, la ausencia de las enzimas MMP8 y MMP13.

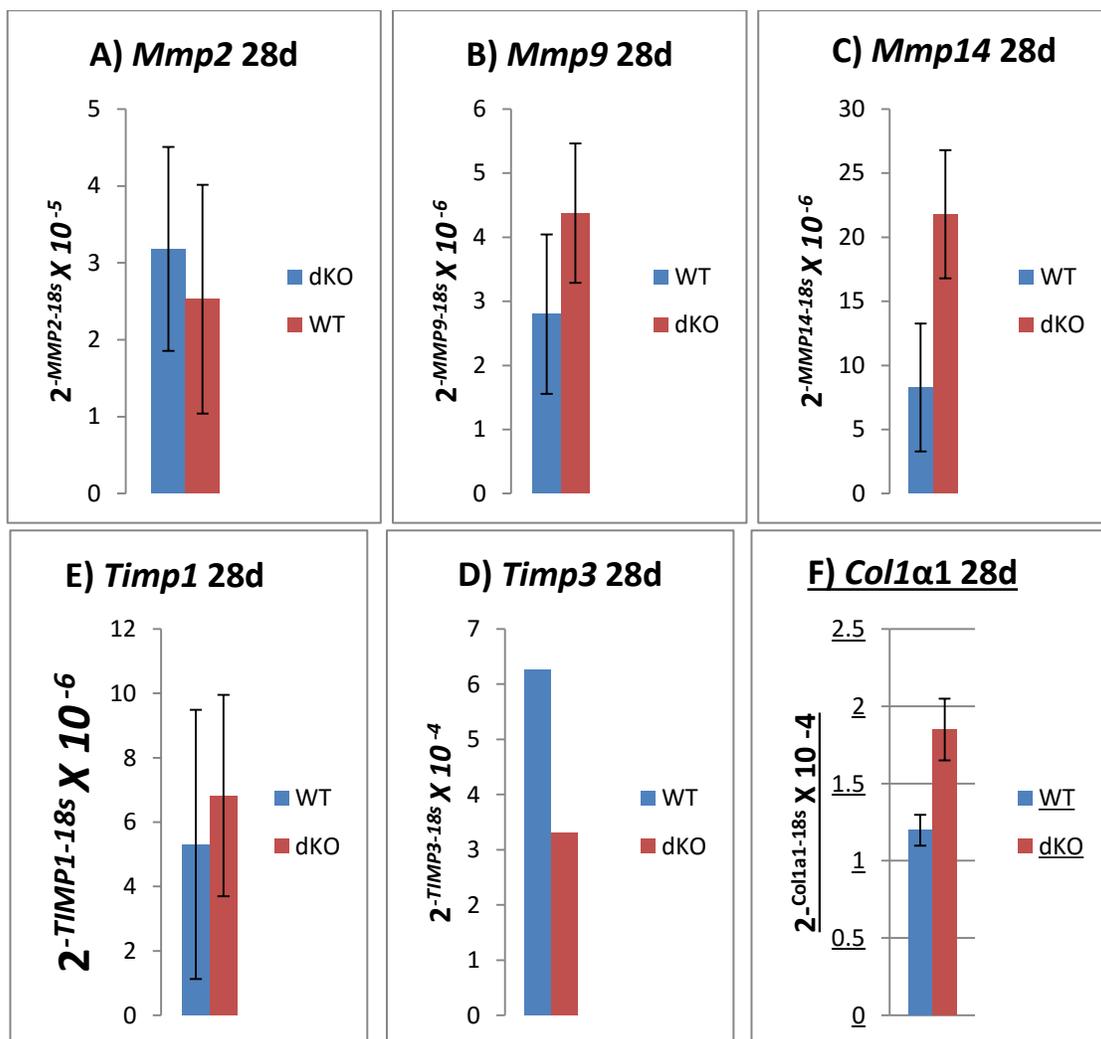


Figura 26. Niveles de expresión génica (2^{-Act}) comparando muestras de tejido pulmonar de ratones WT VS MMP8-13dKO en condiciones fibrosantes (28 días post instilación, n=6, p≤0.05).

Los ratones MMP8-MMP13 doble deficientes, al carecer de las dos principales colagenasas, podrían presentar mecanismos de compensación tales como un aumento de la expresión de alguna de las otras MMPs con capacidad de degradar colágenas fibrilares en el ratón, a saber, MCoIA y la MT1-MMP o MMP14. Como se mencionó previamente, no se detectó la expresión de *McolA* en el pulmón de los ratones WT y doble mutantes en condiciones basales. Se ha descrito previamente que *McolA*, sólo se expresa en estado embrionario, y no en estado post-natal, en condiciones fisiológicas, sin embargo, se ha reportado que la expresión de *McolA*, se puede inducir en condiciones patológicas, como cáncer y fibrosis pulmonar (Fanjul Fernández M, et al, 2013). Para corroborar este resultado, se evaluó la expresión de MCoIA por western blot e inmunohistoquímica a los 28 días post instilación de bleomicina intratraqueal (**Fig. 27**). Por western blot no se observó la proteína MCoIA en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 dKO, ni WT, en condiciones basales. Como se muestra en la **figura 27**, aunque hubo inducción de MCoIA en el pulmón fibrotico (mRNA y proteína) tanto en los ratones WT, como en los MMP8-MMP13 dKO en el pulmón durante la respuesta fibrosante, no hubo diferencias significativas entre los grupos, por lo tanto se puede concluir que la enzima MCoIA, no aumenta en la ausencia de MMP8 y MMP13 durante la fibrosis pulmonar.

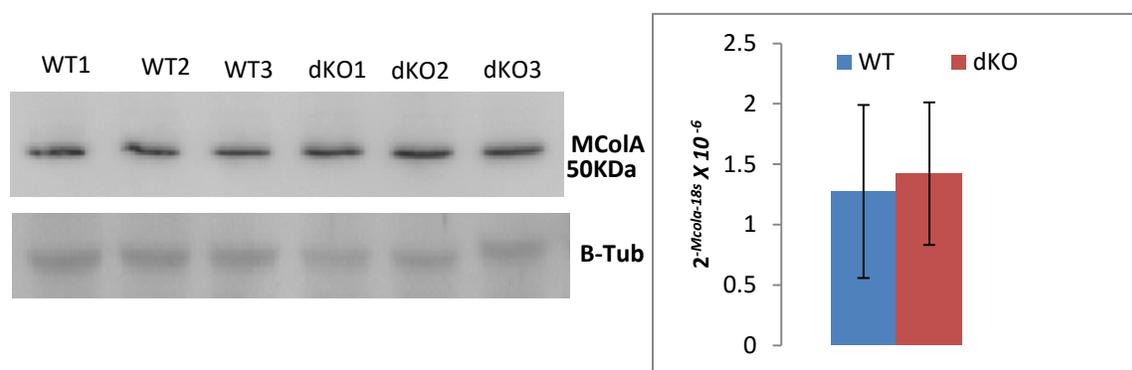


Figura 27. Detección de la proteína MCoIA por Western Blot (Izq) y QPCR (Der) en el pulmón fibrotico derivado de ratones WT y MMP8-MMP13 dKO. No se observaron diferencias en la concentración de MCoIA en los pulmones de ratones WT y MMP8-MMP13 dKO en un período de 28 días post-instilación.

Inmunolocalización de MCoIA.

Para evaluar qué tipos celulares podrían estar expresando la enzima MCoIA, realizamos una inmunohistoquímica en cortes de tejido pulmonar derivado de ratones tratados con bleomicina y sacrificados a los 28 y 42 días. Observamos tinción positiva en macrófagos intraalveolares y en algunas células del epitelio bronquial en los tejidos correspondientes a ratones silvestres. En los pulmones derivados de ratones MMP8-MMP13 dKO observamos tinción positiva en macrófagos, en células epiteliales y en células mesenquimales, también se observa tinción inespecífica en núcleos (**Fig. 28**).

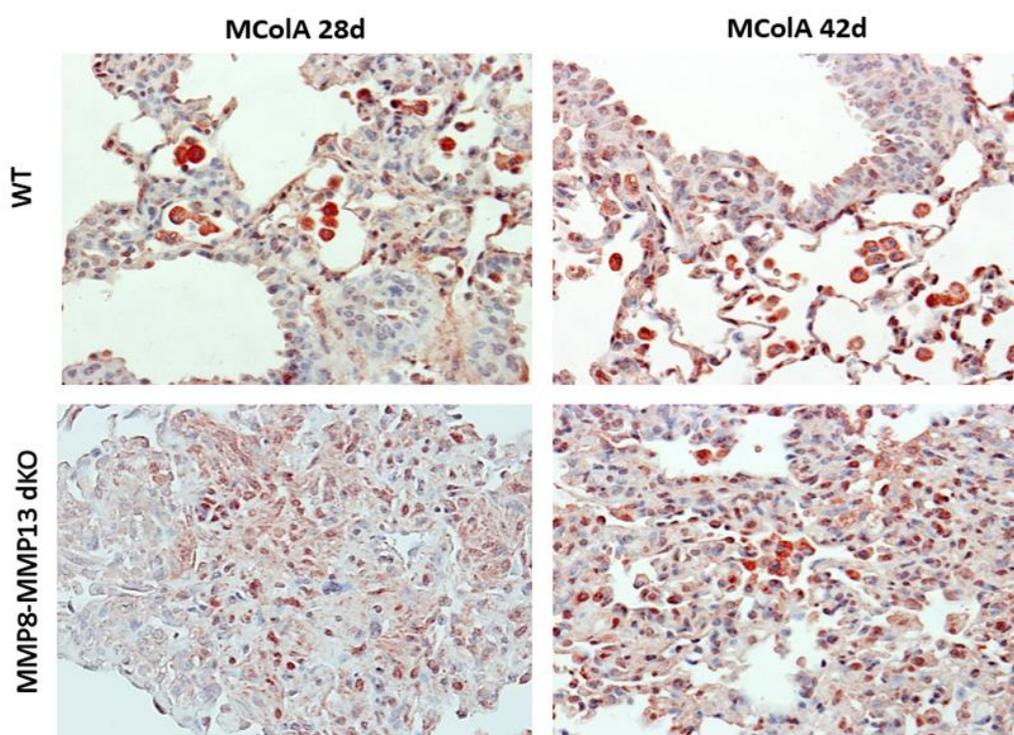


Figura 28. Inmunolocalización de MCoIA en el tejido pulmonar en condiciones fibróticas y de resolución. Panel superior: Pulmón de ratón WT se observan algunos macrófagos y células epiteliales bronquiales positivas en ambos períodos 28 y 42 días. **Panel inferior:** Pulmón de ratón MMP8-MMP13 dKO, además de observarse tinción positiva para macrófagos, se observan células mesenquimales intersticiales positivas, que probablemente sean fibroblastos. 20x.

Immunolocalización de MMP8.

Como se ha descrito previamente, confirmamos que la MMP8 se localiza es principalmente en leucocitos polimorfonucleares, como se muestra en la **figura 29** (panel superior), se observa tinción positiva en neutrófilos en un período de 28 días. Este resultado es paradójico, pues se ha descrito que la inflamación neutrofílica, se resuelve después de 7 días del tratamiento con bleomicina, sin embargo nosotros observamos varios neutrófilos positivos para MMP8 en el período de 28 días. En el período de 42 días post-institución, observamos también señal positiva en macrófagos. Se ha descrito que la MMP8 puede formar heterodímeros con la MMP9, y la MMP9 es una enzima esencialmente expresada en macrófagos. Como se esperaba, no se observó tinción positiva en el pulmón derivado de los ratones MMP8-MMP13 doble deficientes en el período de 28 días post-tratamiento, ni en el período de 42 días (**Fig. 29 panel inferior**).

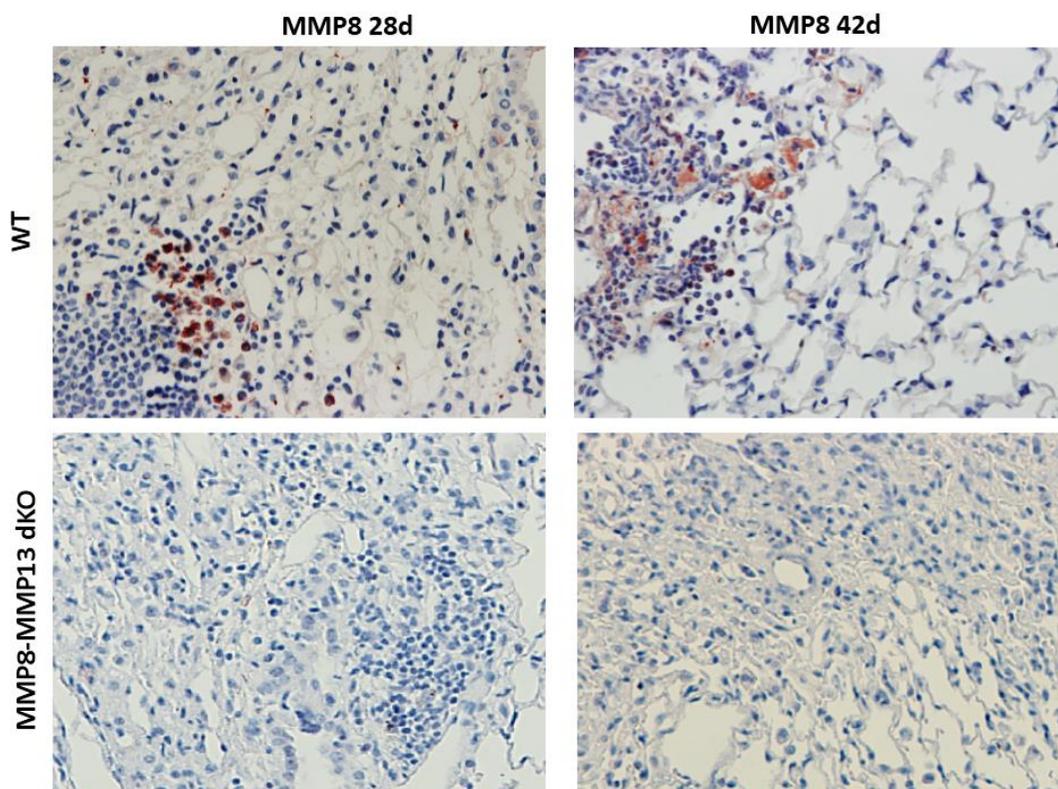


Figura 29. Immunolocalización de MMP8 en el tejido pulmonar en condiciones fibróticas y de resolución. Panel superior: Pulmón de ratón WT, se observan neutrófilos positivos en ambos períodos 28 y 42 días, y en el período de 42 días se observan macrófagos. **Panel inferior:** Pulmón de ratón MMP8-MMP13 dKO, no se observa señal positiva para MMP8.

Inmunolocalización de MMP13.

En pacientes con FPI se ha descrito que la MMP13 se localiza principalmente en epitelio bronquiolar, alveolar y en el espacio intersticial (Nkyimbeng T, et al, 2013). Sin embargo, no existen datos en la literatura de la localización celular de MMP13 en el pulmón de ratón. En el pulmón de ratones WT en un período de 28 y 42 días, observamos señal positiva en algunas células del epitelio alveolar cubodalizado, en epitelio bronquial y en macrófagos alveolares (Fig. 30 Panel superior). Como se esperaba, no se observó tinción positiva en el pulmón derivado de los ratones MMP8-MMP13 doble deficientes en el período de 28 días post-tratamiento, ni en el período de 42 días (**Fig. 30 panel inferior**).

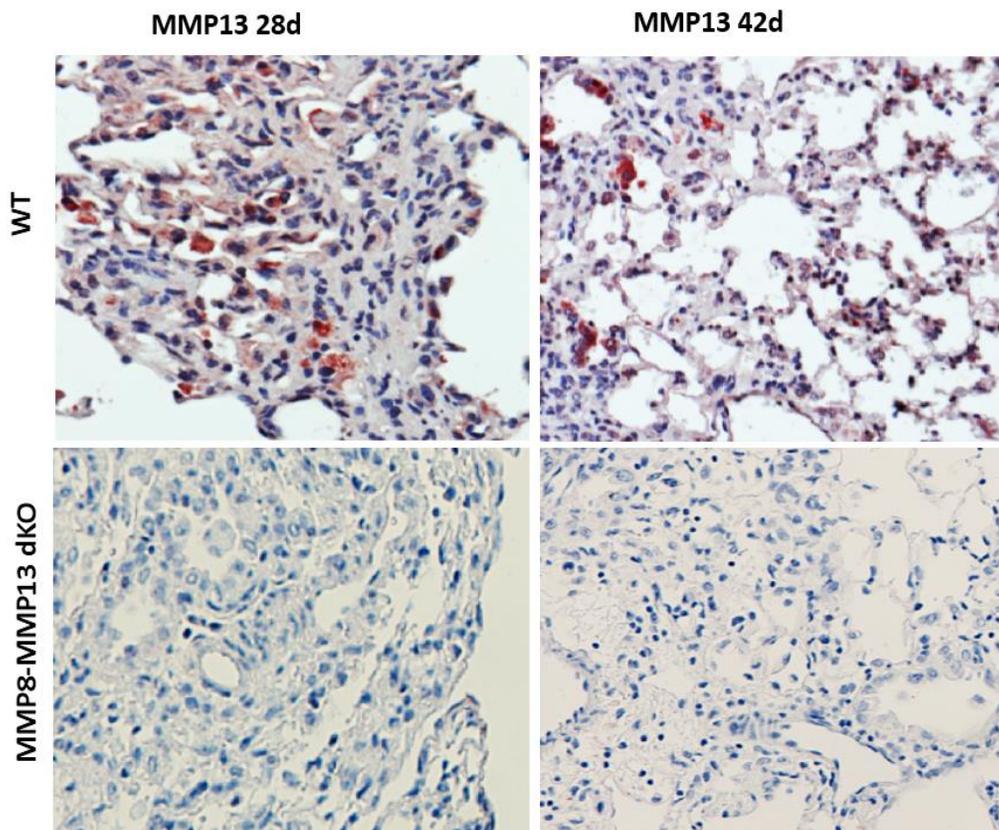


Figura 30. Inmunolocalización de MMP13 en el tejido pulmonar en condiciones fibróticas y de resolución. Panel superior: Pulmón de ratón WT, se observan macrófagos positivos, y epitelio alveolar y bronquiolar en ambos períodos 28 y 42 días. **Panel inferior:** Pulmón de ratón MMP8-MMP13 dKO, no se observa señal positiva para MMP13.

Inmunolocalización de TIMP1.

Como describimos previamente, encontramos un aumento significativo de TIMP1 en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 doble deficientes, en condiciones basales, sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la etapa fibrosante (28 días post-bleomicina) por QPCR. Con el objeto de localizar la expresión de TIMP1 en el pulmón, usamos un anticuerpo específico contra TIMP1. No detectamos señal positiva en el pulmón control ni en WT, ni en el doble mutante MMP8-MMP13 (datos no mostrados), a pesar de que por QPCR observamos un nivel de expresión mayor en éstos últimos. En el pulmón fibrótico, tanto en el pulmón de los individuos WT, como en el pulmón de los MMP8-MMP13 doble deficientes, se identificó señal positiva en macrófagos alveolares e intersticiales, en fibroblastos, y también asociado a la MEC. Se sabe que la MEC es un reservorio de TIMP1 y TIMP3. Aunque no encontramos diferencias en el nivel de TIMP1 en la etapa fibrosante entre los dos grupos, la señal positiva fue más intensa en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 doble deficientes a los 28 y 42 días, en comparación con su respectivo control WT (Figura 31).

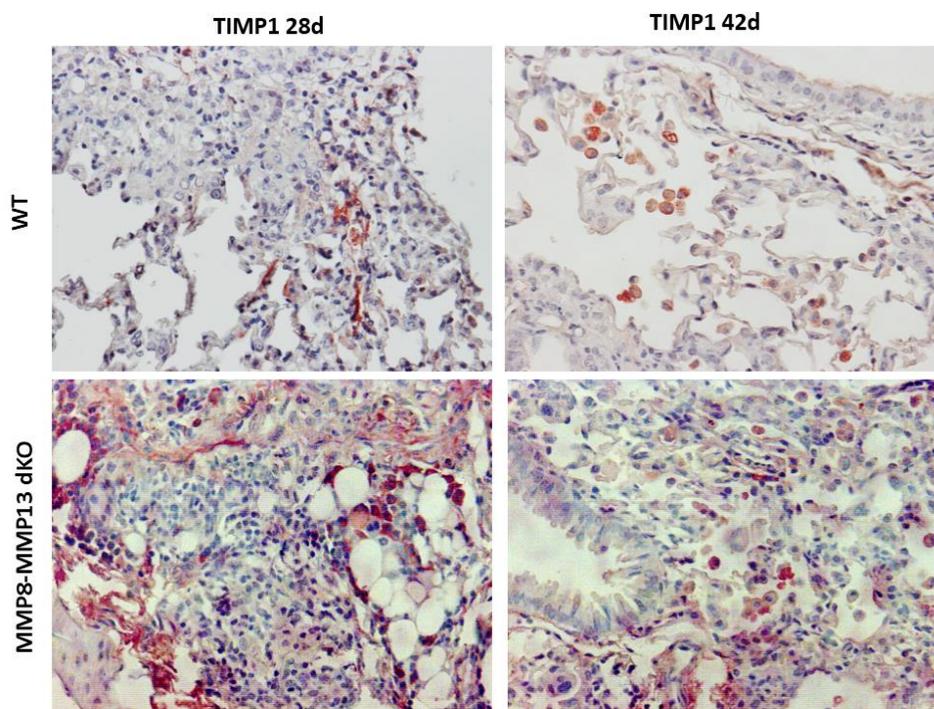


Figura 31. Inmunolocalización de TIMP1 en el tejido pulmonar en condiciones fibróticas y de resolución. Se observa señal positiva en la MEC, en fibroblastos y en macrófagos alveolares e intersticiales en ambos genotipos.

Inmunolocalización de MMP2 y MMP9.

Previamente, en mi tesis de licenciatura, demostré por zimografía en geles de gelatina, que la actividad enzimática de las enzimas MMP2 y MMP9 se encontraba incrementada significativamente en el pulmón y en el lavado bronquio-alveolar derivado de los ratones MMP8-MMP13 dKO durante la etapa fibrosante de la enfermedad (28 días post instilación), al compararlos con su contraparte WT (Vergara F, 2013). Respecto a los resultados del análisis de expresión por QPCR, no encontramos diferencias significativas en el nivel de mRNA de MMP2 y MMP9 a los 28 días post-instilación; sin embargo, era importante evaluar en dónde se localizan éstas enzimas en el tejido pulmonar durante la etapa fibrosante y de resolución. Con este objetivo, se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos contra MMP2 y MMP9, durante la etapa fibrosante (28 días post-instilación) y en la etapa de resolución (42 días post-instilación).

En el tejido pulmonar de ratones MMP8-MMP13 dKO durante la etapa fibrosante, se observó tinción positiva para MMP2 principalmente en macrófagos alveolares e intersticiales, y en algunas células epiteliales tanto en el pulmón de los ratones WT, como en los doble mutantes MMP8-MMP13, sin embargo, en éstos últimos, se observó mayor número de células teñidas positivamente, tanto a los 28, como a los 42 días, en comparación con su respectivo control WT. Adicionalmente, en el pulmón del ratón MMP8-MMP13 doble deficiente, se observan algunos fibroblastos positivos en el período de 28 días (**Figura 32**). En el tejido proveniente de ratones WT, cabe señalar que la tinción positiva ocurrió con menor intensidad, sugiriendo una cantidad de antígeno (proteína) menor que en el ratón MMP8-MMP13 dKO, lo que correspondería con un menor nivel de MMP2, observado previamente mediante la técnica de zimografía (Vergara F, 2013) (**Figura 32**).

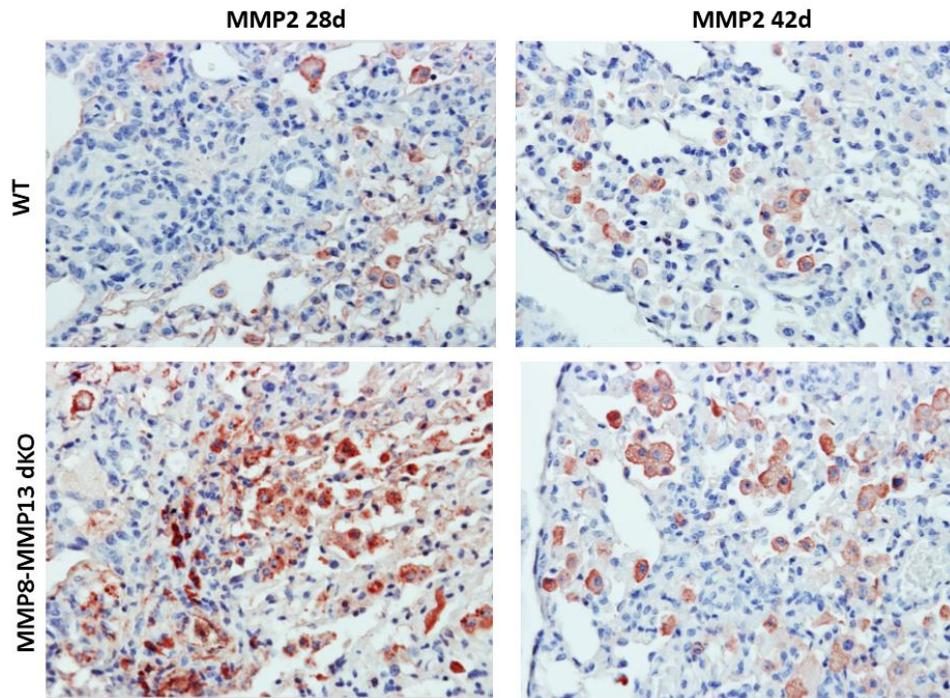


Figura 32. Inmunolocalización de MMP2 en el tejido pulmonar en condiciones fibróticas y de resolución. Panel superior: Pulmón de ratón WT, se observan macrófagos positivos en los espacios intraalveolares, en ambos períodos 28 y 42 días. **Panel inferior:** Pulmón de ratón MMP8-MMP13 dKO, se observan macrófagos positivos en los espacios intraalveolares, en algunos fibroblastos y en epitelio alveolar y bronquiolar.

Con respecto a la inmunolocalización de la MMP9, en el tejido pulmonar de ratones MMP8-MMP13 dKO durante la etapa fibrosante, se observó tinción positiva principalmente en macrófagos alveolares e intersticiales, tanto en el pulmón de los ratones WT, como en los doble mutantes MMP8-MMP13, sin embargo, en éstos últimos, se observó mayor número de células teñidas positivamente, tanto a los 28, como a los 42 días, en comparación con su respectivo control WT (Fig. 33). Además de que el número de macrófagos positivos en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 dKO fue mayor, la intensidad de la señal positiva en éstas células también fue mayor (Fig. 33, panel inferior). Sin embargo, como se describió anteriormente, no se encontraron diferencias a nivel mRNA, pero coincide con un mayor nivel de MMP9 identificado previamente por zimografía.

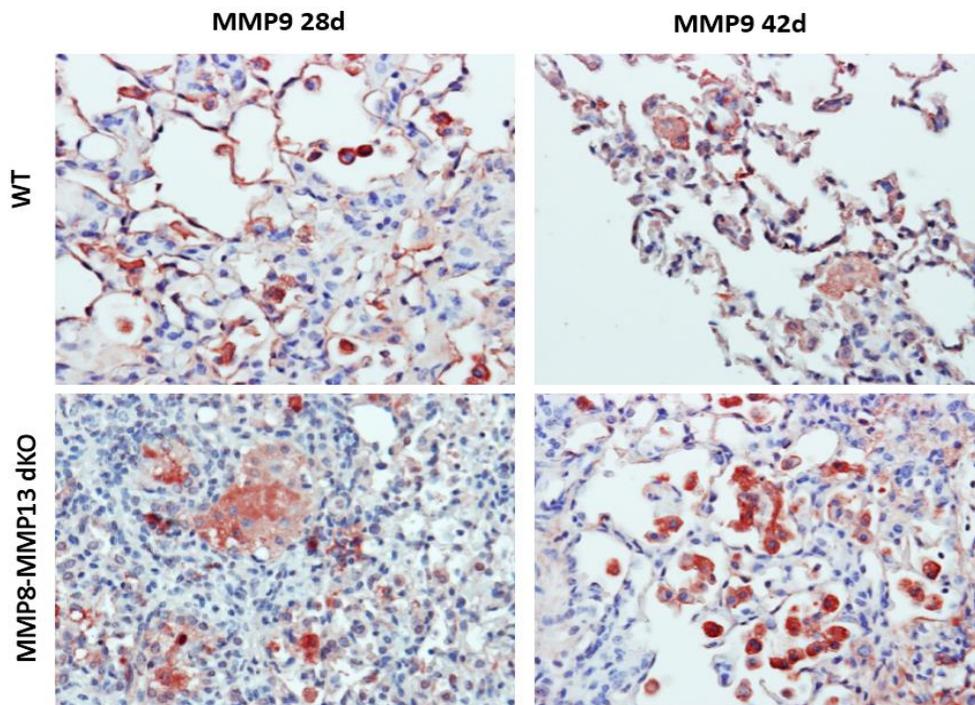


Figura 33 Inmunolocalización de MMP9 en el tejido pulmonar en condiciones fibróticas y de resolución. **Panel superior:** Pulmón de ratón WT, se observan macrófagos positivos en los espacios intraalveolares, y en epitelio alveolar en ambos períodos 28 y 42 días. **Panel inferior:** Pulmón de ratón MMP8-MMP13 dKO, se observan macrófagos positivos en los espacios intraalveolares.

A continuación se muestra un resumen de la localización celular de distintas MMPs y de TIMP1 en el pulmón de los ratones WT y MMP8-MMP13 dKO después del daño pulmonar inducido por bleomicina.

Tabla 2. Inmunolocalización de MMPs y TIMPs.

	WT	MMP8-MMP13 dKO	Comentarios adicionales
MCoIA	Macrófagos y algunas células epiteliales	Macrófagos, epitelio y fibroblastos (células mesenquimales)	Tinción positiva inespecífica en núcleos
MMP8	Neutrófilos y macrófagos	sin señal	-----
MMP13	Epitelio bronquial y alveolar cuboidalizado, macrófagos	sin señal	-----
TIMP1	MEC y macrófagos	MEC, fibroblastos y macrófagos	Señal positiva intensa en MMP8-MMP13 dKO
MMP2	Macrófagos	Macrófagos, epitelio y fibroblastos	Señal positiva intensa en MMP8-MMP13 dKO
MMP9	Macrófagos y algunas células epiteliales alveolares	Macrófagos	Señal positiva intensa en MMP8-MMP13 dKO

El modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratón se utiliza comúnmente para estudiar los mecanismos de la fibrosis pulmonar en humanos y para poner a prueba posibles intervenciones terapéuticas. Las FPI tiene múltiples factores patogénicos, genéticos y ambientales, esto representa un desafío para el descubrimiento de genes que juegan un papel relevante en la patogénesis, donde más bien se tiene que tener en cuenta la influencia combinada de más de un gen, y uno o más factores ambientales. Sin embargo, la identificación de las diferencias fenotípicas, cuando se usan modelos de ratones modificados genéticamente, que subyacen a la susceptibilidad o a la protección de la fibrosis, es crucial para entender el proceso de la enfermedad, su progresión o reversibilidad, y para el desarrollo de pruebas y tratamientos terapéuticos.

En esta tesis se evaluó el efecto de ausencia simultánea de las enzimas MMP8 y MMP13, usando un modelo doble deficiente. La caracterización fenotípica de este ratón no ha sido publicada previamente. Este ratón es completamente viable y fértil y no tiene alteraciones fenotípicas evidentes. Resultó interesante utilizar a este ratón doble mutante, como un modelo de deficiencia en la colagenólisis sistémica, debido a que las principales colagenasas en roedores, son precisamente la MMP8 y la MMP13. Como se ha descrito previamente, un gen análogo a *MMPI*, *MColA*, no se expresa en estado adulto en los tejidos murinos, con excepción de ciertas patologías. En este contexto resultó interesante preguntarnos ¿cuál sería la respuesta fibrosante en un ratón que carece de colagenasas?, ¿podría haber fenómenos de compensación por otras enzimas?, ¿cómo sería el desarrollo de la fibrosis?

Condiciones basales.

Inicialmente evaluamos la histología del pulmón de ratones WT y MMP8-MMP13 doble deficientes, y no se identificaron diferencias morfológicas en condiciones basales. Las estructuras alveolares, bronquiolares y bronquiales se observaron preservadas en los ratones de ambos genotipos, y no se observó acumulación espontánea de colágena en el pulmón de ratones MMP8-MMP13 doble deficientes. También se evaluó la expresión de *MCol A*,

Mmp2, Mmp7, Mmp8, Mmp9, Mmp13, Mmp14, Timp1, Timp3, Lox, Coll1a1 y *Coll3a1* en el pulmón en condiciones basales. Como se esperaba, no se encontró expresión de *Mmp8* y *Mmp13* en los ratones MMP8-MMP13 doble deficientes. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de *Mmp2, Mmp14, Timp3, Lox, Coll1a1* y *Coll3a1*. Solo se identificó una disminución significativa en la expresión de *Mmp9* y un aumento significativo en la expresión de *Timp1*, en comparación con los ratones WT. La expresión de *Mmp7* y *MColA* no fue detectada en el pulmón en condiciones basales ni en el WT, ni en el doble mutante. Por IHC no se detectó señal positiva para las proteínas MColA, MMP2, MMP8, MMP9, MMP13, TIMP1, en el pulmón en condiciones basales ni en los ratones WT, ni en los doble mutantes. Esto confirma evidencias previas, que indican que la expresión de MMPs en el pulmón normal es muy baja, y que sólo la expresión de MMP2 es constitutiva. El aumento en la expresión de *Timp1* en ausencia de *Mmp8* y *Mmp13* resulta paradójico, pues podría especularse que al no haber expresión de estas enzimas, la expresión de uno de sus inhibidores específicos podría estar disminuida.

Modelo de fibrosis pulmonar (Etapa fibrosante).

Después de un período de 28 días post-instilación de bleomicina, tanto los ratones silvestres como los mutantes desarrollaron fibrosis, caracterizada por acumulación de fibras de colágena, engrosamiento de la MEC y proliferación de fibroblastos intersticiales. Sin embargo, los ratones doble deficientes MMP8-MMP13 exhibieron una fibrosis más extensa y severa, caracterizada por una densa acumulación de colágena fibrilar en el parénquima pulmonar, evaluada por tinción tricrómica de Masson.

Al analizar la expresión a nivel de ARNm de *MCol A, Mmp2, Mmp7, Mmp8, Mmp9, Mmp13, Mmp14, Timp1, Timp3, Lox, Coll1a1* y *Coll3a1*, observamos que la expresión de *Mmp14* en los pulmones de ratones doble deficientes se elevó 4 veces, durante la etapa fibrosante, comparando con su contraparte silvestre. El aumento de *Mmp14* podría explicar el incremento en la actividad de MMP2 en lavado bronquio-alveolar y en el pulmón a los 28 días, observado previamente por zimografía en geles de gelatina (Vergara F, 2013), dado que MMP14 funge como el principal activador fisiológico de la pro-MMP2, al formar el complejo ternario MMP14-TIMP1-pro-MMP2 (Brew K, et al, 2010). El incremento en la expresión de MMP14, también podría estar ocurriendo como consecuencia de la ausencia

de MMP13 y la acumulación de fibras de colágena intersticial. Será interesante evaluar posteriormente los posibles mecanismos de activación del gen de la MMP14, y será necesario confirmar el aumento de MMP14 a nivel de proteína. Dado que la MMP14 o MT1-MMP es una colagenasa pericelular potente, es posible que su sobreexpresión en ausencia de la MMP8 y la MMP13, sea un fenómeno compensatorio.

La expresión de MCoIA fue identificada en el pulmón de los ratones WT y MMP8-MMP13 en condiciones fibrosantes, tanto a nivel de mRNA, como de proteína, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Este resultado sugiere que la expresión de MCoIA solo se induce en condiciones patológicas, sin embargo no se observa un fenómeno compensatorio por ésta colagenasa en el pulmón de los doble mutantes.

Respecto a las otras colagenasas, en el pulmón del ratón WT, por IHC, se observó señal positiva para MMP8 en neutrófilos y en macrófagos principalmente, a los 28 y 42 días post-institación. La MMP13, se observó en el pulmón de los ratones WT, en epitelio alveolar cuboidalizado y en macrófagos, tanto a los 28, como a los 42 días después del tratamiento con bleomicina. En el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 dKO, no se observó señal positiva para MMP8, o para MMP13.

Bajo ciertas condiciones, se ha observado que las gelatinasas A y B, o MMP2 y MMP9 muestran actividad colagenolítica, aunque con una menor eficiencia en comparación con las colagenasas. A nivel de mRNA no se observó un incremento en la expresión de los genes *Mmp2* y *Mmp9* durante la etapa fibrosante en ninguno de los genotipos. Esto concuerda con lo observado en el ratón *Mmp13*^{-/-}, por Nkyimbeng et al 2013, en donde describen un aumento de la susceptibilidad del ratón KO a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, además de un incremento en la actividad de las gelatinasas a partir de la etapa inflamatoria. Además, en este estudio también se describe un aumento de la actividad de las gelatinasas en tejidos de pacientes con FPI, sin que haya un aumento a nivel de ARNm.

Por IHC, observamos tinción positiva para MMP2 y MMP9 principalmente en macrófagos alveolares e intersticiales, y en algunas células epiteliales tanto en el pulmón de los ratones WT, como en los doble mutantes MMP8-MMP13, sin embargo, en éstos últimos, se observó mayor número de células teñidas positivamente, tanto a los 28, como a los 42 días, y además la intensidad de la señal positiva fue mayor en comparación con su respectivo

control WT. Es interesante el aumento en la actividad de las gelatinasas durante la etapa fibrosante ya que los principales sustratos de estas enzimas son colágenas desnaturalizadas (sin estructura de triple hélice), y la colágena tipo IV y laminina, componentes principales de la membrana basal. Esto puede ser importante porque la integridad estructural de las paredes alveolares depende de la integridad de la membrana basal y, ya que durante el desarrollo de fibrosis pulmonar ocurre destrucción del epitelio alveolar, es ampliamente aceptado que la destrucción de la membrana basal puede preceder el desarrollo de la enfermedad. Además, una discontinuidad en la membrana basal puede permitir mayor acceso de células intersticiales al espacio

Es posible que un aumento en la actividad de MMP2, podría deberse a un aumento de su activador MT1-MMP junto a TIMP1. Por IHC, observamos que la tinción positiva para TIMP1 fue mayor en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 tanto a los 28, como a los 42 días post-instilación. Sin embargo, esta observación tendrá que corroborarse a nivel proteína por western blot. A nivel mRNA no se encontraron diferencias significativas, esto resulta sorprendente, ya que en condiciones basales se identificó un nivel de expresión de *Timp1* mayor en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13.

Modelo de fibrosis pulmonar (Etapa de resolución).

Para evaluar si la fibrosis en el ratón MMP8-MMP13 doble deficiente progresaba o había resolución, se decidió ampliar el modelo de bleomicina a un período de 42 días. Numerosas evidencias sugieren que la fibrosis inducida por bleomicina empieza a revertir después de la 4 semana post-instilación. Esto ha sido una limitante del modelo para el estudio de la FPI, ya que en el caso de esta enfermedad en el humano, la fibrosis es progresiva y letal. Además, los datos en la literatura son contradictorios, existen estudios que demuestran que la fibrosis revierte a partir de los 28 días, otros han demostrado que aún después de 56 días la resolución no es total, es decir, los análisis histológicos muestran que el pulmón no tiene una morfología 100% normal, siempre se identifican microfocos de fibrosis o enfisema.

En nuestro modelo, se observó un retraso de la resolución los pulmones de ratones MMP8-MMP13 dKO, evaluado en un período de 42 días post-instilación. Mientras la histología de los pulmones de ratones silvestres mostró una regresión casi total de la fibrosis, corroborado por la cuantificación de hidroxiprolina, en el pulmón de los ratones MMP8-

MMP13 dKO, observamos que, aunque ya hay una disminución de la fibrosis, existe un retraso en la resolución de la enfermedad, caracterizado por amplias áreas de daño y gran cantidad de fibras de colágena intersticial. También es notable la presencia un epitelio cuboidal y engrosamiento de la MEC en el espacio intersticial, con focos de colágena fibrilar. Esto podría deberse a la carencia de la principal colagenasa intersticial en roedores, la MMP13 o colagenasa 3. Además, como se identificó por IHC en el WT, la MMP8 y la MMP13 son expresada en macrófagos, células clave en los procesos de resolución de la fibrosis.

La reversión de la fibrosis pulmonar ha sido poco estudiada, y existen más evidencias en estudios de fibrosis hepática, tanto en humano, como en modelos experimentales. En la fibrosis hepática, se ha demostrado que la actividad de colagenasas en el hígado aumenta y que la regresión de la fibrosis, se caracteriza también por la apoptosis de fibroblastos y miofibroblastos en los focos de fibrosis densa. En consecuencia, la estimulación de la apoptosis de fibroblastos, ha surgido como una posible diana terapéutica. Los macrófagos también son reguladores clave de la remodelación de la matriz. En un estudio reciente utilizando un ratón transgénico (CD11b-DTR) como modelo, que permitió la eliminación selectiva de macrófagos durante las diferentes etapas de lesión hepática y durante la resolución, mostró funciones divergentes para estas células. Durante el inicio y la progresión de la fibrosis hepática, los macrófagos asociados a la cicatriz promovieron la fibrogénesis, mientras que durante la resolución de la fibrosis, los macrófagos participaron en la degradación acelerada de la matriz, principalmente a través del aumento en la producción de MMP13 (Ramachandran P, et al, 2012; Fallowfield JA, et al, 2007).

Una observación interesante, es que las zonas de fibrosis que no experimentan remodelación son ricas en macromoléculas de la MEC, tales como elastina que facilitan la actividad de las enzimas lisil-oxidasa y transglutaminasa, que catalizan el entrecruzamiento ("cross linking") de colágenas fibrilares, lo que sugiere que el entrecruzamiento de las fibras podría representar un " punto de no retorno " en la fibrosis. Además, la acumulación progresiva de colágena, con el tiempo puede crear una gran masa de matriz, que es inaccesible a las enzimas de degradación afectando la reversibilidad de la fibrosis. Datos recientes, que detallan la cinética de resolución en fibrosis hepática, sugieren que si el foco

de fibrosis es acelular, puede ser menos reversible en comparación con un foco de fibrosis que es altamente celular y que además está infiltrado por células inflamatorias, debido a que en ausencia de células existe una depleción relativa de las MMP colagenolíticas, que son producidas y secretadas por las células mismas (Brown RA, et al, 2013; Perepelyuk M, et al, 2013).

La contribución de las enzimas MMP8 y MMP13 no ha sido estudiada en la resolución de la fibrosis pulmonar. Los resultados de este proyecto muestran que la ausencia de ambas enzimas resulta en una fibrosis muy severa, caracterizada por una acumulación excesiva de colágena, y un retraso en la resolución. Como se mencionó en la introducción, ya se ha reportado el fenotipo de los ratones Mmp8 y Mmp13 nulos, el ratón MMP8 KO desarrolla menos fibrosis en comparación con el WT, sin embargo desarrolló una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por un infiltrado inflamatorio caracterizado principalmente por neutrófilos. El modelo de bleomicina se siguió hasta un período 42 días (6 semanas post-tratamiento) y se observó que la resolución de la fibrosis ocurrió de forma similar al ratón WT (García-Prieto E, et al, 2010.) Respecto al ratón MMP13 nulo, el desarrollo de fibrosis evaluado con el modelo de bleomicina, reveló que los ratones mutantes fueron más susceptibles a la enfermedad, respecto a los WT, sin embargo, el modelo se siguió solo hasta el día 28 y no se siguió posteriormente (Nkyimbeng, 2013).

Este proyecto estuvo centrado en evaluar el fenotipo de un ratón doble nulo de MMP8-MMP13. Se definió que éste ratón es más susceptible a la fibrosis pulmonar, y además que la resolución de la fibrosis o del daño tuvo un retardo en un período de 42 días. Es importante señalar que los mecanismos celulares y moleculares de éste fenotipo no se han esclarecido, y será necesario evaluar otros sustratos distintos a la MEC. Se podría evaluar el perfil de expresión génica global en el pulmón en condiciones basales, y en condiciones patológicas, durante la etapa inflamatoria y fibrosante, así como en la etapa de la resolución, para identificar genes diferencialmente expresados. También se podría evaluar la actividad colagenolítica por ensayos de cinética enzimática, con sustratos colagénicos fluorescentes, para determinar la actividad colagenolítica global, en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 doble deficientes en comparación con su respectivo control WT, en condiciones basales y patológicas.

- Se logró estandarizar un método adecuado para la determinación del genotipo de los animales silvestres y dobles deficientes MMP8-MMP13.

Condiciones basales

- No existen diferencias en la histología del pulmón, en condiciones basales, entre los ratones dobles deficientes de MMP8-MMP13 y los silvestres. No se encontró expresión de Mmp8 y Mmp13 en los ratones MMP8-MMP13 doble deficientes, lo que confirma la deficiencia de estas enzimas.
- No se encontraron diferencias significativas en el contenido de hidroxiprolina pulmonar en condiciones basales entre los ratones dobles deficientes de MMP8-MMP13 y los silvestres.
- No se encontraron diferencias significativas en la expresión de Mmp2, Mmp14, Timp3, Lox, Col1a1 y Col13a1.
- Se identificó una disminución significativa en la expresión de MMP9 en condiciones basales en el pulmón de los ratones MMP8-MMP13 doble deficientes.
- La expresión de Mmp7 y MColA no fue detectada en el pulmón en condiciones basales ni en los ratones WT, ni en los doble mutantes.
- Por IHC no se detectó señal positiva para las proteínas MColA, MMP2, MMP8, MMP9, MMP13, TIMP1, en el pulmón en condiciones basales ni en los ratones WT, ni en los doble mutantes.

Condiciones patológicas.

- Después de inducir el modelo de fibrosis pulmonar por bleomicina los ratones dobles deficientes de MMP8-MMP13 presentaron una mayor extensión del daño y mayor depósito de colágena a los 28 días post instilación, comparado con los ratones WT.
- El índice de clínico fue significativamente mayor en el ratón doble deficiente de MMP8-MMP13 a los 28 días post-instilación con bleomicina, en comparación con su control WT.

- El contenido de hidroxiprolina pulmonar fue significativamente mayor en el ratón doble deficiente de MMP8-MMP13 a los 28 días post-instilación con bleomicina, en comparación con su control WT.
- La expresión de MMP14 o MT1-MMP a nivel mRNA se encuentra elevada en el pulmón los ratones MMP8-MMP13 dKO, durante la etapa fibrosante, al compararlo con su contraparte WT.
- La expresión de MColA se identificó en el pulmón a nivel mRNA y proteína, solo en condiciones patológicas, tanto en el WT, como en el MMP8-MMP13 dKO, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos.
- Se observó expresión de MMP8 en neutrófilos y macrófagos, y de MMP13 en epitelio alveolar cuboidalizado y macrófagos a los 28 y 42 días post-instilación en el pulmón de los ratones WT.
- No se detectó señal positiva de MMP8 y MMP13 por IHC en el pulmón de ratones MMP8-MMP13 dKO.
- Por IHC, observamos tinción positiva para MMP2 y MMP9 principalmente en macrófagos alveolares e intersticiales, y en algunas células epiteliales tanto en el pulmón de los ratones WT, como en los doble mutantes MMP8-MMP13, sin embargo, en éstos últimos, se observó mayor número de células teñidas positivamente, tanto a los 28, como a los 42 días.
- Por IHC, se identificó señal positiva para TIMP1 en macrófagos alveolares e intersticiales, en fibroblastos, y también asociado a la MEC, tanto en el pulmón de los ratones WT, como en los doble mutantes MMP8-MMP13, sin embargo, en éstos últimos, se observó mayor número de células teñidas positivamente, tanto a los 28, como a los 42 días.
- Los ratones dobles deficientes de MMP8-MMP13 sufren un retraso en la resolución de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, mientras que los ratones silvestres presentaron una resolución casi total a los 42 días post instilación, sin embargo la resolución del daño no fue total, y fue heterogénea, ya que el pulmón de algunos ratones WT presentaron pequeños focos de depósito de MEC. Todos los ratones MMP8-MMP13 dKO mostraron una histología anormal a los 42 días.

- El índice de clínico fue significativamente mayor en el ratón doble deficiente de MMP8-MMP13 a los 28 días post-instilación con bleomicina, en comparación con su control WT.
- El contenido de hidroxiprolina pulmonar fue significativamente mayor en el ratón doble deficiente de MMP8-MMP13 a los 28 días post-instilación con bleomicina, en comparación con su control WT.
- El pulmón de ratones MMP8-MMP13 dKO mostraron un epitelio cuboidalizado en la etapa de resolución.

Debido a la amplia diversidad de sustratos que pueden ser procesados y regulados por las MMPs, sabemos que no simplemente actúan como degradadoras de proteínas estructurales, sino como componentes activos de una red muy fina de regulación de diferentes vías de señalización, migración, inflamación, fagocitosis, apoptosis, entre otras, lo cual es muy importante para nuestra comprensión del desarrollo de la fibrosis pulmonar y en fenómenos de reparación o resolución del daño pulmonar. Resulta curioso notar que el ratón deficiente para una colagenasa (MMP8) se encuentra protegido a la fibrosis pulmonar, mientras que el ratón deficiente para MMP13 presenta un aumento en la susceptibilidad, muy similar a la susceptibilidad que presenta el ratón doble deficiente de este trabajo. Esto deja en manifiesto que, aunque ambas enzimas tienen como sustrato principal fibras de colágena, no cumplen el mismo papel en los distintos tipos celulares en el tejido en que se encuentran, ni cumplen el mismo papel en las distintas etapas de la enfermedad.

-
- **Alberts B**, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología Molecular de la célula* (4ª ed.), Ed. Omega, Barcelona, 2004.
 - **Atkinson JJ**, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Jan;28(1):12-24.
 - **Benyon RC**, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 2001 Aug;21(3):373-84.
 - **Betsuyaku T**, Fukuda Y, Parks WC, Shipley JM, Senior RM. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am J Pathol.* 2000 Aug;157(2):525-35.
 - **Brew K.**, Nagase H. The Tissue Inhibitors of Metalloproteases (TIMPs): An Ancient Family with Structural and Functional Diversity. *Biochim Biophys Acta.* Enero 1803(1) pp 55-71, 2010. Doi: 10.1016/j.bbamer.2010.01.003
 - **Brown RA.** In the beginning there were soft collagen-cell gels: towards better 3D connective tissue models? *Exp Cell Res.* 2013 Oct 1;319(16):2460-9.
 - **Cabrera S.**, Bleomicina un Modelo de Fibrosis Pulmonar. *Rev Inst Nac Enf Resp Mex* Vol 19 No.1 2006 pp 53-61
 - **Cabrera S**, Gaxiola M, Arreola JL, 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.* 2007;39(12):2324-38. Epub 2007 Jul 12.
 - **Cabrera S**, Selman M, Lonzano-Bolaños A, Konishi K, Richards TJ, Kaminski N, Pardo A. Gene expression profiles reveal molecular mechanisms involved in the progression and resolution of bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013 May 1;304(9):L593-601.
 - **Clark I.**, Swingler E., Sampieri C., Edwards D. The Regulation of Metalloproteases and their Inhibitors. *The International Journal of Biochemistry and cell Biology.* 2008 (40) pp. 1362-1378. doi:10.1016/j.biocel.2007.12.006

- **Craig V.**, Quintero P., Fyfe S., Patel A., Knolle M., Kobzik L., Owen C. Profibrotic Activities for MMP8 During Bleomycin Mediated Lung Injury. *J. Immunol.* 2013, 190(8) pp 483-4296. Doi: 10.40 49/jimmunol.1201043
- **Craig VJ**, Polverino F, Laucho-Contreras ME, Shi Y, Liu Y, Osorio JC, Tesfaigzi Y, Pinto-Plata V, Gochuico BR, Rosas IO, Owen CA. Mononuclear phagocytes and airway epithelial cells: novel sources of matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2014 May 14;9(5):e97485.
- **Craig V.**, Zhang L., Hagood J., Owen C. Metalloproteases as Therapeutic Targets for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *AJRCMB*, 2015. Doi:10.1165/rcmb.2015/0020TR
- **D'Armiento J**, Shiomi T, Lemaître V, Okada Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathology International* Vol. 60, pp 477-496, 2010. Doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02547.
- **Dunsmore S.**, Rannels Eugene. Extracellular Matrix Biology in the Lung. *American Journal of Physiology.* 1996, 270, L3-L27. Doi:1040-0605/96
- **Godefroy E**, Olivier M, Dréno B, Hochman T, Rolnitzky L, Guilloux N, Goldberg J, Jotereau F, Bhardwaj N. Matrix Metalloproteinase-2 Conditions Human Dendritic Cells to Prime Inflammatory Th2 cells via an IL12 and OX40L-Dependent Pathway. *Cancer Cell* 19, 333-346, March 15, 2011. Doi: 10.1016/j.cc.2011.01.037
- **Fallowfield JA**, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield JS, Iredale JP. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol.* 2007 Apr 15;178(8):5288-95.
- **Fanjul-Fernández M**, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1803(1):3-19.
- **Fanjul-Fernández M**, Folgueras AR, Fueyo A, Balbín M, Suárez MF, Fernández-García MS, Shapiro SD, Freije JM, López-Otín C. Matrix Metalloprotease Mmp1a is dispensable for normal growth and fertility in mice and promotes lung cancer progression by modulating inflammatory responses. *J Biol Chem.* 2013. Mayo 17; 288 (29):14647-56

- **García-Prieto E**, González-López A, Cabrera S, Astudillo A, Gutiérrez-Fernández A, Fanjul-Fernandez M, Batalla-Solís E, Puente XS, Fueyo A, López-Otín C, Albaiceta GM. Resistance to bleomycin-induced lung fibrosis in MMP-8 deficient mice is mediated by interleukin-10. *PLoS One*. 2010 Oct 7;5(10):e13242..
- **Geoffrey L**, John Hay, Shahriar Shahzeidi. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Arch Toxicol* Vol 65 pp 81-94, 1991.
- **Gomis-Rüth X.**, Tallant C., Marrero A. MPPs: Fold and Function of Their Catalytic Domains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803 pp20-28, 2010. Doi:10.1016/j.bbamer.2009.04.003
- **Greenlee K**, Werb Z, Farrahkheradmand F. Matrix Metalloproteinases in Lung: Multiple, Multifarious and Multifaceted. *Physiol Rev* 87: 69–98,2007; doi:10.1152/physrev.00022.2006.
- **Gutierrez-Fernandez A**, Inada M, Balbin M, Fueyo A, Pitiot AS, Astudillo A, Hirose K, Hirata M, Shapiro SD, Noel A, Werb Z, Krane SM, Lopez-Otin C, Puente XS. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *FASEB J*. 2007; 21:2580–2591. [PubMed: 17392479].
- **Inada M**, Wang Yingmin, Byrne M, Rahman M, Miyaura C, López-Otín C, Krane S. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *PNAS* Vol 101, No. 49, pp 17192-17197. 2004. Doi: 10.1073/pnas.0407788101.
- **Jiang D**, Liang J, Hodge J, Lu B, Zhu Z, Yu S, Fan J, Gao Y, Yin Z, Homer R, et al. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor cxcr3. *The Journal of clinical investigation* 2004;114(2):291-299.
- **Kim K**, Burkhart K, Chen P, Charles W. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency amplifies acute lung injury in bleomycin-exposed mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 33. pp 271–279, 2005 DOI: 10.1165/rcmb.2005-0111OC
- **Klose RJ**, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.31 No.2 February 2006. doi:10.1016/j.tibs.2005.12.008

- **Kong D**, Zhang F, Zhang Z, Lu Y, Zheng S. Clearance of activated stellate cells for hepatic fibrosis regression: molecular basis and translational potential. *Biomed Pharmacother.* 2013 Apr;67(3):246-50.
- **Liu X**, Xu J, Brenner DA, Kisseleva T. Reversibility of Liver Fibrosis and Inactivation of Fibrogenic Myofibroblasts. *Curr Pathobiol Rep.* 2013 Sep;1(3):209-214.
- **Löffek S**, Schilling O, Franzke C-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011; 38: 191–208 DOI: 10.1183/09031936.00146510
- **Marie-Claire R.**, Elisabeth A., Frederic M. Integrin $\alpha 1\beta 1$ mediates collagen induction of MMP13 expression in MC605 Chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1746 pp 55-64, 2005. Doi: 10.1016/j.bbamer.2005.08.003
- **Morales M.**, Veronica Della Latta, S. Del Ry. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacological Research* Vol. 97 pp 122-130, 2015.
- **Mott J**, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Oct; 16(5): 558–564. doi: 10.1016/j.ceb.2004.07.010.
- **Nagase H**, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69 (2006) 562 – 573. Doi:10.1016/j.cardiores.2005.12
- **Nkyimbeng T.**, Ruppert C., Shiomi F., Dahal B., Lang G. Pivotal Role of MMP13 in Extracellular Matrix Turnover in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Plos One* 8(9): e73279, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone0073279
- **Oin Yu**, Ivan Stamenkovic, Cell Surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-B and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes and Development.* 2000. Doi: 14:163-176.
- **Pardo A.**, Selman, M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci.* 2002. 7: d1743-d1761.
- **Pardo A.**, Selman, M. Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Am Thorac Soc.* 2006. 3: 383-388.
- **Parks W.** Matrix metalloproteinases in lung repair. *Eur Resp J* 22. 2003. Doi: 10.1183/09031936.

- **Perepelyuk M**, Terajima M, Wang AY, Georges PC, Janmey PA, Yamauchi M, Wells RG. Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Mar 15;304(6):G605-14.
- **Ramachandran P**, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, Hartland SN, Snowdon VK, Cappon A, Gordon-Walker TT, Forbes SJ, Iredale JP. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 13;109(46):E3186-9.
- **Selman M.**, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Sep;279(3):L562-74.
- **Selman M.**, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res*. 2002;3:3.
- **Selman M.**, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Jan 15;173(2):188-98.
- **Sen AI**, Shiomi T, Okada Y, D'Armiento JM. Deficiency of matrix metalloproteinase-13 increases inflammation after acute lung injury. *Exp Lung Res*. 2010 Dec;36(10):615-24.
- **Somerville R**, Oblander S, Apte S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 4:216. 2003. Doi: 0.1186/gb-2003-4-6-216.
- **Tager AM**, Kradin RL, LaCamera P, Bercury SD, Campanella GS, Leary CP, Polosukhin V, Zhao LH, Sakamoto H, Blackwell TS, et al. Inhibition of pulmonary fibrosis by the chemokine ip-10/cxcl10. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2004;31(4):395-404
- **Thickett D.R.**, Dancer R.C.A., Wood A.M. Metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*; 38: 1461–1467, DOI: 10.1183/09031936.00024711, 2011.

- **Vincenti M.**, Brinckerhoff C. Transcriptional Regulation of Collagenase Genes in arthritis: Integration of Complex Signaling Pathways for the Recruitment of Genes Specificity. *Arthritis Research* Vol. 4 No. 3 2001
- **Visse R.**, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res J*, 2;92(8):827-39. 2003. Doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
- **Weiss A.**, Khokha R., Murthy A. MMPs and Their Natural Inhibitors in Inflammation and Immunity. *Nature Reviews immunology*, vol 13 2013 pp 649-666 doi: 10.1038/nri3499
- **Werb Z.**, Ewald A., Page-McCaw A. Matrix Metalloproteinases and the Regulation of Tissue Remodelling. *Nature Review, Molecular Cell Biology*, March, pp 221-233, 2007. Doi: 10.1038/nrm2125
- **Willis B.**, Roland M, Zea B. Epithelial Origin of Myofibroblasts during Fibrosis in the Lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jun; 3(4): 377–382. doi: 10.1513/pats.200601-004TK
- **Yamashita C.**, Dolgonos L, Zemans RL, Young SK, Robertson J, Campbell MN, Yu G, Kaminski N, McCulloch CA, Downey GP. Matrix metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2011 Oct;179(4):1733-45.
- **Yan C & Boyd, D. D.** (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Physiol.*, 211, 19–26.
- **Yu G.**, Kovkarova-Naumovski E, Jara P, Parwani A, Kass D, Ruiz V, Lopez-Otín C, Rosas IO, Gibson KF, Cabrera S, Ramírez R, Yousem SA, Richards TJ, Chensny LJ, Selman M, Kaminski N, Pardo A. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Oct doi:15;186(8):75262.
- **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*. 2002 Apr 30;99(9):6292-7.

