



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE MMP-28 SOBRE DIFERENTES FUNCIONES DEL
EPITELIO ALVEOLAR Y MECANISMOS INVOLUCRADOS EN SU POSIBLE
LOCALIZACIÓN NUCLEAR**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARIEL SOFÍA MALDONADO BONILLA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. ANNIE PARDO CEMO
FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTOR
DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
DR. JULIO MORÁN ANDRADE
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA ,CD. MX., ABRIL, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Alma Mater, sobre todo a la Facultad de Ciencias y a la Facultad de Medicina.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) por permitirme continuar con mi formación académica.

Al Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP), por los estímulos recibidos para poder presentar los avances de la investigación en distintos congresos nacionales e internacionales.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca número 275771 y por el apoyo de beca mixta para la estancia en Alemania.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo #IN218516.

Al Comprehensive Pneumology Center (CPC), al Helmholtz Zentrum München, al Hospital Universitari Bellvitge y a la Universidad de Barcelona por las facilidades brindadas durante mis estancias de investigación.

A mi Comité Tutor conformado por la Dra. Annie Pardo Cemo, la Dra. Vilma Maldonado Lagunas y el Dr. Julio Morán Andrade, por las asesorías y recomendaciones tanto de cada tutorial como de cada ocasión en que los consulté.

A los miembros del jurado de Examen de Grado: Dra. María Eugenia Gonsebatt, Dr. Jorge Meléndez Zajgla, Dra. Victoria Chagoya y Dra. Teresa Fortoul.

A mi tutora, la Investigadora Emérita, Dra. Annie Pardo Cemo, un honor ser su alumna y aprender de ella y con ella en cada una de las etapas de este posgrado. Muchas gracias por su confianza y recomendaciones, siempre.

Al Dr. Moisés Selman por creer en mí y apoyarme.

A la Dra. Rosario Perona y al Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de la Universidad Autónoma de Madrid por permitir mi breve visita.

A la Sociedad Mexicana de Bioquímica (SMB), a la *American Thoracic Society (ATS)*, a la *American Society of Cell Biology (ASCB)* y al *Academic Writing Course UNAM-Canadá*.

A todos los investigadores con los que colaboré y cuyas aportaciones permitieron que esta investigación fuera publicada. A Iliana Herrera por su auxilio incondicional. A Sandra Cabrera por ayudarme con el modelo de daño inducido por bleomicina. A Alfonso Salgado por las miles de horas invertidas. A Ivette Buendía Roldán por todo lo que se dedicó en el estudio de biomarcador. A Reme, porque la palabra sigue siendo compartir. A la Dra. Blanca Ortíz por su auxilio en la citometría de flujo. A Anne Manicone por compartirnos su ratón. A Alberto Pizaña y al personal del bioterio, por estar al pendiente de la colonia de ratones. A Vane y a María Molina por *llevarme en su bicicleta*. A Lurdes Planas, Ana Montes y todo el equipo de María Molina.

A Claudia Staab-Weijnitz, Oliver Eickelberg y todos los miembros del CPC que me apoyaron mientras estuve por allá. A Dieter Jenne, Silke Meiners, Vanessa Welk, Gerald Burgstaller, Natalia Smirnova, Elisabeth Hennen, Fien M. Verhamme, Nina Noskovičová, Larissa Knüppel, Heike Hofmann, Mareike Lehmann, Arunima Sengupta, Dibora Tibebu y Doreen Franke.

A Criselda Mendoza por su apoyo personal y científico, en la citometría de flujo y en la vida. A Carina Becerril por su sabiduría infinita en todos los aspectos. A Ana Lilia Torres por las pláticas, asesorías y por enseñarme a hacer geles súper delgados. A Ana Mayela Valero por enseñarme a extraer células epiteliales de ratón. A José Cisneros por su siempre bien recibido frío punto de vista y por el apoyo en asuntos burocráticos, compra de material y reactivos. A Marco Espina por las recomendaciones con los ensayos de mimic. A Martha Montañó y Carlos Ramos por su siempre cálida bienvenida al laboratorio.

A Paty Zurita, quien con su abrazo mañanero hizo mejor cada día. Al Dr. Miguel Gaxiola por la evaluación morfológica de las laminillas de ratón. A la Dra. Teresa Santos por prestarme su incubadora de bacterias cuando aún no teníamos. A Cuauhtémoc por el apoyo con los experimentos de hipoxia. Al INER, sus trabajadores administrativos, afanadores y personal del comedor que me alimentaron día y noche.

Al Comité Académico del PDCB, a la secretarías técnicas, de enlace y auxiliares.

A los investigadores que imparten cursos dentro del PDCB de quienes aprendí bastante.

A Miguel Negreros, mi Miguelito querido. A Adrián Munguía por no dejarme en el abismo. A Hugo por impulsarme a ser mejor y continuar mi camino. A todos los integrantes del enorme grupo de investigación Pardo-Selman UNAM-INER. A Ily ☺. A Gaby Díaz siempre presente, Yalbi Balderas y su confianza, Mariana Maciel Baby, Erika Rubí Luis y su increíble fortaleza, Juan Manuel QPQPQMA, Andrea Magali, Andrés Iglesias, Ángeles García, Fernanda Toscano, Soledad, Yair Romero, Jorge García, Víctor Ruiz, Miguel Ramírez, Anita Vega, Marco Checa, Eduardo Montes y a Damaris. A Mickey Mejía.

A M. Esther Bonilla López, Luis David Maldonado y Daniela Esther Maldonado, Margarita Juárez, Pamela Gasca y Javier Martínez, quienes me acompañan siempre, mi familia, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN _____	13
OBJETIVOS _____	24
MÉTODOS _____	25
RESULTADOS _____	34
DISCUSIÓN _____	57
CONCLUSIONES _____	62
REFERENCIAS _____	63

ÍNDICE DESGLOSADO

	Página
RESUMEN	9
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	
Aparato respiratorio	13
Enfermedades pulmonares intersticiales difusas	14
Neumonitis por hipersensibilidad	15
Fibrosis pulmonar idiopática	16
Metaloproteasas de matriz	19
MMPs en FPI	20
MMP28	22
MMP28 en FPI	23
OBJETIVOS	24
MÉTODOS	
Muestras de pulmones humanos	25
Bacterias y plásmidos	25
Cultivo Celular	26
Infección con partículas lentivirales	
Transfección	
Silenciamiento de células epiteliales bronquiales (BEC)	
Diferenciación <i>in vitro</i> de BEC	
Estímulos	
Modelo murino	28
Daño pulmonar inducido por bleomicina.	
Cuantificación de hidroxiprolina.	
Extracción de células epiteliales de pulmón.	
Imaging	29
Reacción en cadena de la polimerasa	29
Extracción y análisis de proteínas	29
Efectos funcionales	30

Tasa de crecimiento	
Proliferación	
Ensayo de cierre de herida	
Migración en cámara Boyden	
Ensayo de citometría para detectar apoptosis	
ELISA	32
Estadística	32
Anticuerpos	32
Oligonucleótidos	33
RESULTADOS	
Población de estudio	34
MMP28 está aumentada en FPI	34
Las células epiteliales de FPI expresan MMP28	36
Localización intracelular de MMP28 <i>in vitro</i>	39
Mecanismo de translocación nuclear	41
Evidencia por WB de MMP28 en núcleo	42
Expresión de MMP28 durante diferenciación de BEC	44
Sobreexpresión y silenciamiento de MMP28	45
MMP28 aumenta la tasa de crecimiento y proliferación	47
MMP28 protege de apoptosis	49
MMP28 favorece la transición epitelio a mesénquima	49
MMP28 promueve migración	50
Los efectos de MMP28 dependen de su actividad catalítica	51
La mutación KQ no afecta la actividad de MMP28	52
Análisis de Mmp28 en modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina	53
MMP28, prometedor biomarcador diagnóstico	54
DISCUSIÓN	57
MMP28 como biomarcador	60
CONCLUSIONES	62

REFERENCIAS	63
APÉNDICE. Protocolos.	73
ANEXOS	
Anexo A. Autenticidad de línea celular A549.....	88
Anexo B. Artículo en American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.....	89

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, asociada al envejecimiento, de etiología desconocida, en la que las células epiteliales alveolares anormalmente activadas inducen la expansión y activación de la población de fibroblastos que llevan a la destrucción de la arquitectura pulmonar. Algunas metaloproteasas de matriz (MMPs) están sobreexpresadas en la FPI, indicando que podrían ser importantes en la patogénesis y/o progresión de este padecimiento. En este trabajo, se estudió la expresión de MMP28 en FPI y se evaluaron sus efectos funcionales en dos líneas celulares de neumocitos y en células epiteliales bronquiales de cultivo primario de humano. La localización de la enzima se demostró como apical y citoplásmica en células bronquiales y como nuclear y citoplásmica en células alveolares. *In vitro*, el silenciamiento de MMP28 disminuyó la tasa de proliferación y retrasó el cierre de herida, mientras que la sobreexpresión mostró los efectos opuestos, protegió de apoptosis y favoreció la transición epitelio a mesénquima. Los resultados demuestran que la MMP28 está aumentada en células epiteliales de pulmones de pacientes con FPI en donde probablemente participa aumentando, de manera dependiente de su actividad catalítica, el fenotipo proliferativo y migratorio. El ratón deficiente en *Mmp28* desarrolló menos fibrosis inducida por bleomicina y sus células epiteliales migraron menos que las del silvestre (*ex vivo*). Además, se midió la concentración sérica en dos cohortes de pacientes en donde se encontró que esta enzima está aumentada en FPI con respecto a sujetos sanos y un grupo de pacientes con otros tipos de fibrosis pulmonar, por lo que podría utilizarse como un biomarcador para el diagnóstico de FPI.

Abstract

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a chronic aging-associated disease of unknown etiology, in which aberrant activated alveolar epithelial cells induce the expansion and activation of the fibroblast population leading to the destruction of the lung architecture. Some Matrix Metalloproteinases (MMPs) are upregulated in IPF, indicating that they may be important in its pathogenesis and/or progression. Here, MMP28 expression was studied in IPF and its functional effects were evaluated in two alveolar epithelial cell lines and in human primary bronchial epithelial cells. The enzyme localization was shown as apical and cytoplasmic in bronchial cells, and cytoplasmic and nuclear in alveolar cells. *In vitro*, MMP28 epithelial silencing decreased the proliferation rate and delayed wound closing, while overexpression showed the opposite effects, protected from apoptosis and enhanced epithelial-mesenchymal transition. These findings demonstrate that MMP28 is upregulated in epithelial cells from IPF lungs where it may play a role in increasing the proliferative and migratory phenotype in a catalytic-dependent manner. Mmp28 deficient mice developed less bleomycin-induced fibrosis and their epithelial lung cells showed decreased migration over collagen I (*ex vivo*). In addition, its serum concentration was measured in two different cohorts where it was found higher in IPF versus non-IPF patients and healthy controls, so it might be a useful biomarker to improve diagnostic certainty of IPF.

Abreviaturas

aa	residuo de aminoácido
agua dde	agua destilada desionizada esterilizada.
APS	persulfato de amonio
AR	artritis reumatoide
BAL	lavado bronquio-alveolar
BEC	células epiteliales bronquiales
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CPC	<i>Comprehensive Pneumology Center</i>
CTD	<i>connective tissue disease</i>
CTGF	factor de crecimiento del tejido conjuntivo
DAPI	4', 6-diamino 2-fenil-indol
DEPC	dietilpirocarbonato
DLCO	capacidad de transferencia del CO ₂
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EPID	enfermedad pulmonar intersticial difusa
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FPI	fibrosis pulmonar idiopática
FVC	capacidad vital forzada
gDNA	ácido desoxirribonucleico genómico
HPRT	hipoxantina fosforribosiltransferasa
IP	inmunoprecipitación
kDa	kilo daltones
MC	medio condicionado
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteasa de matriz
mRNA	ácido ribonucleico mensajero

NEM	N-Etilmaleimida
NH	neumonitis por hipersensibilidad
NINE	neumonía intersticial no específica
NIU	neumonía intersticial usual
pb	pares de bases
PBS	solución amortiguadora salina de fosfatos
PBS-T	PBS con tween-20 al 0.05%
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SLN	señal de localización nuclear
SS	síndrome de Sjögren
TA	temperatura ambiente
TBS	solución amortiguadora salina de Tris-HCl
TEM	transición epitelio a mesénquima
TEMED	tetrametiletildiamina
TGF- β 1	factor de crecimiento transformante beta-1
TLC	capacidad pulmonar total.
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
UPR	respuesta a proteínas mal plegadas
VR	volumen residual

INTRODUCCIÓN

Aparato respiratorio

El proceso de intercambio de gases se compone de tres partes: a) la ventilación pulmonar que es el flujo mecánico de aire hacia los pulmones y su salida de ellos, b) la respiración externa que es el intercambio de gases entre los alveolos y la sangre, y c) la respiración interna que es el intercambio de gases entre los eritrocitos en los capilares y las células de los tejidos. Además del intercambio de gases, el aparato respiratorio desempeña otras funciones como ser un filtro para proteger otros órganos como cerebro, corazón y riñones; así como regular el balance ácido-base (pH sanguíneo). El aparato respiratorio se compone de nariz, faringe, laringe, tráquea, bronquios y pulmones (Tórtora y Grabowski, 2002; Silverthorn, 2009).

La región anterior del aparato respiratorio comienza por la nariz, siguen la faringe y la laringe que se continúa con la tráquea. Ésta se subdivide en bronquios y éstos en bronquiolos. El epitelio de los bronquios es un epitelio pseudoestratificado columnar ciliado con numerosas células caliciformes. Este epitelio entra en transición conforme se ramifican los bronquiolos, primero hacia un epitelio simple columnar ciliado y luego hacia un epitelio cúbico no ciliado. Los bronquiolos terminales incluyen bronquiolos respiratorios, ductos y sacos alveolares, y se consideran la zona respiratoria de los pulmones. En el pulmón humano existen más de 300 millones de alveolos cubiertos de capilares. El epitelio del bronquiolo respiratorio es principalmente cuboidal y puede estar ciliado, ya no hay células caliciformes. La capa delgada de soporte se compone de músculo liso y colágena (Uribe Aranzábal MC y Aguilar Morales, 2002).

La pared alveolar es muy delgada, está formada por epitelio escamoso (neumocitos tipo I) cubiertos de surfactante, un fluido rico en fosfolípidos y proteínas producido por los neumocitos tipo II, células con bordes redondeados y microvellosidades. El surfactante mantiene los alveolos abiertos porque reduce la tensión superficial permitiendo la dilatación y distensión de los alveolos sin peligro de colapsar durante el proceso de ventilación; asimismo, provee humedad a la superficie para llevar a cabo un intercambio gaseoso eficiente. El epitelio respiratorio está compuesto en un 98% por neumocitos tipo I (Silverthorn, 2009).

La membrana respiratoria, donde ocurre la difusión del oxígeno hacia la sangre y la

liberación del dióxido de carbono al espacio aéreo alveolar, está compuesta por: i) la pared alveolar (neumocitos tipo I y tipo II, y macrófagos alveolares, aunque el intercambio ocurre con los tipo I), ii) la membrana basal epitelial, iii) la membrana basal capilar y iv) células endoteliales (Tórtora y Grabowski, 2002).

En la clínica, las lesiones focales de pacientes con desórdenes respiratorios son difíciles de detectar porque el pulmón tiene reservas funcionales importantes. Puede haber ocasiones donde la función se altera con poco o nada de correlación entre la morfología y la lesión. Se utiliza la espirometría para obtener las medidas de volumen pulmonar de los sujetos que acuden a consulta. Por ejemplo, TLC por sus siglas en inglés, se refiere a capacidad pulmonar total, se define como la cantidad de aire que reside en los pulmones y vías aéreas después de una inspiración máxima. Volumen residual es la cantidad de aire en el tracto respiratorio después de una espiración máxima. La capacidad vital forzada (FVC) es la capacidad máxima de aire que puede inhalarse y expulsarse en condiciones forzadas. Un paciente con fibrosis pulmonar tiene un volumen normal de reserva al inhalar (IRV), la gráfica de espirometría se mueve hacia abajo, disminuye la TLC y el VR casi no cambia. En cambio en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la gráfica se mueve hacia arriba, hay mayor volumen tidal debido a que la exhalación ocurre contra una obstrucción anatómica o fisiológica, hay menor capacidad inhalatoria y mayor VR. Por otra parte, se mide el grado de eficacia con que el gas pasa desde los alveolos hacia los capilares sanguíneos en un minuto, esta medida de difusión se conoce como capacidad de transferencia del CO₂ (DLCO) (Tórtora y Grabowski, 2002; Silverthorn, 2009).

Enfermedades pulmonares intersticiales difusas

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) son un conjunto variado de entidades clinicopatológicas que presentan síntomas parecidos entre sí, en los que se observa menor volumen pulmonar debido a una alteración en el parénquima pulmonar que lleva a un desajuste en el equilibrio entre ventilación y perfusión. En los análisis espirométricos es común encontrar disminución de TLC, FVC y DLCO. Incluyen más de 150 padecimientos diferentes cuya etiología es conocida sólo en el 30% de ellos. Entre las causas se encuentran ciertos medicamentos, partículas orgánicas e inorgánicas, procesos autoinmunes, sarcoidosis y vasculitis (Xaubet et al, 2007; Molina Molina, 2008).

La fibrosis pulmonar es el resultado final de muchas EPID, se caracteriza por la acumulación

excesiva de proteínas de matriz extracelular (MEC), principalmente colágenas fibrilares, producto de una reparación epitelial anómala. El proceso fibrosante en las EPID no está restringido al intersticio —espacio entre la membrana basal del epitelio alveolar y la membrana basal del endotelio— sino que también se observa en los espacios alveolares (Xaubet et al, 2007; Selman y Pardo, 2008). Casi 45% de las muertes en países desarrollados se pueden atribuir a enfermedades crónico fibroproliferativas (Mora et al, 2017).

Quince por ciento de los pacientes con enfermedades colágeno-vasculares, presentan una EPID: CTD (*connective tissue disease*). CTD se refiere a desórdenes caracterizados por daño autoinmune asociado a autoanticuerpos circulantes dirigidos a diversos órganos. La mayoría de los pacientes con EPID asociada a CTD presentan un cuadro clínico progresivo e irreversible caracterizado por inflamación o fibrosis del parénquima pulmonar. La EPID se puede identificar en todas las CTD, es común encontrarla en artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjögren (SS), polimiositis, dermatomiositis y esclerosis sistémica (Koo y Uh, 2017).

Neumonitis por hipersensibilidad

La neumonitis por hipersensibilidad (NH), también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es un desorden inmunopatológico que ocurre en individuos susceptibles donde mecanismos celulares y humorales participan en el desarrollo de lesiones pulmonares. Representa un grupo de enfermedades provocadas por la exposición repetida a una gran variedad de partículas orgánicas como proteínas de desechos de aves, hongos, bacterias y compuestos de bajo peso molecular. Sus bases genéticas no se conocen con precisión. (Molina Molina, 2008; Selman y Buendía-Roldán, 2012).

Se clasifica en aguda, subaguda y crónica. El diagnóstico de NH se basa en evidencia de un antígeno documentado por los anticuerpos correspondientes, síndrome tipo influenza: fiebre, escalofríos, malestar general, tos, dolor de cabeza y artralgia; aumento de linfocitos y neutrófilos en BAL, y mejora significativa después de la remoción del paciente del ambiente de sospecha, así como recaída en la siguiente exposición. Sin embargo, a veces es imposible identificar al antígeno causal, o bien, el intervalo entre exposiciones y clímax de síntomas es tan largo que es complicado establecer la relación causa – efecto. Los pacientes pueden progresar a fibrosis irreversible y morir pocos años después del diagnóstico (Selman

et al, 2012; Selman y Buendía-Roldán, 2012).

Fibrosis pulmonar idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una EPID irreversible, asociada al envejecimiento, con opciones terapéuticas muy limitadas y cuya patogénesis no se conoce con precisión. Se ha propuesto recientemente que resulta de una compleja interacción de factores de riesgo genéticos y ambientales, procesos acelerados del envejecimiento del pulmón, y una reprogramación epigenética estocástica, que provoca la activación aberrante de las células epiteliales alveolares, las cuales producen mediadores profibróticos que estimulan el robustecimiento de la población de fibroblastos, su diferenciación a miofibroblastos y la producción de grandes cantidades de MEC llevando a la destrucción del parénquima pulmonar (Selman et al, 2001; Selman et al, 2014; Selman et al, 2016).

La FPI está asociada al envejecimiento y de hecho casi todas las marcas clave de este proceso están presentes de manera permanente o exagerada, en particular en los neumocitos: acortamiento de telómeros, mitocondrias disfuncionales, inestabilidad genómica, pérdida de proteostasis, senescencia, fallas en la detección de nutrientes y en la comunicación intercelular. En cuanto a factores genéticos, se han descrito varias alteraciones comunes en los casos de FPI familiar; por ejemplo: mutaciones en la proteína surfactante C pueden estar acompañadas de alteraciones en la respuesta del retículo endoplásmico a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés), polimorfismos en el gen de la mucina 5B, así como mutaciones en diversas proteínas involucradas con el mantenimiento de los telómeros (King et al, 2011; Selman et al, 2016; Martinez et al, 2017).

Dentro de las afectaciones epigenéticas se sabe que hay cambios en el metiloma, modificaciones en histonas y desregulación en miRNAs. Los factores de riesgo ambientales incluyen al tabaquismo, algunos virus como Epstein-Barr y microaspiraciones con contenido gástrico. En los neumocitos de FPI se han encontrado otros virus latentes del tipo herpes como son citomegalovirus y el asociado a sarcoma de Kaposi, colocalizando con marcadores de estrés de retículo y UPR, marcas relacionadas con la patogénesis de FPI (Martinez et al, 2017).

En contraste con la mayoría de los procesos fibróticos en los cuales la inflamación desempeña un papel patogénico, en el caso de la FPI las células epiteliales producen prácticamente todos los mediadores que contribuyen al aumento del número de fibroblastos y

miofibroblastos, y al remodelaje de la MEC. De hecho, los pacientes no mejoran con antiinflamatorios y más aún éstos aumentan la mortalidad (Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network et al, 2014). Entre los mediadores producidos por las células epiteliales se encuentran entre otros el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor derivado de células estromales (CXCL12) y osteopontina, así como factores de la coagulación como el factor VIIa, el X, y el inhibidor del activador de plasminógeno, implicados en la fibrogénesis. Al mismo tiempo, los miofibroblastos pueden inducir apoptosis epitelial por secreción de angiotensinógeno y especies reactivas de oxígeno que afectan la reepitelización (Martínez et al, 2017).

Como respuesta al daño pulmonar, se ha propuesto que, además de que las células mesenquimatosas pulmonares migran, proliferan y sintetizan MEC, parte de los fibroblastos y miofibroblastos provienen de la transición epitelio a mesénquima (TEM) de epiteliales alveolares o mesoteliales, así como de células troncales derivadas de médula ósea y fibrocitos circulantes (Willis et al, 2005; Andersson-Sjöland et al, 2008; Selman et al, 2016).

La reepitelización es el proceso por el cual el epitelio alveolar restaura su integridad en condiciones normales. Consta de la proliferación, migración y diferenciación de los neumocitos tipo II a tipo I. En contraste, en la FPI, las células epiteliales pierden su integridad –probablemente sin daño externo, el cual solía ser considerado como necesario--, y toman uno de cuatro caminos posibles (**fig. 1**): a) proliferar y migrar cubriendo zonas que tenían un epitelio de neumocitos tipo I, esto es metaplasia, ya sea cuboidal o escamosa, b) entrar a un estado de senescencia, c) morir por apoptosis, o bien, d) perder sus marcadores epiteliales y ganar marcadores de fibroblasto: TEM (Martínez et al, 2017; Xu et al, 2016; Willis et al, 2005).

Se ha encontrado que algunas células epiteliales de FPI presentan marcadores tanto de neumocitos tipo I, como de tipo II y bronquiales. Aparentemente los neumocitos se mueren o entran en senescencia y un segundo grupo de células progenitoras positivas para queratinas 5 y 14, son las que median la respuesta anómala de reparación favoreciendo la fibrosis y dando lugar a las estructuras conocidas como panal de abeja (Mora et al, 2017; Xu et al, 2016).

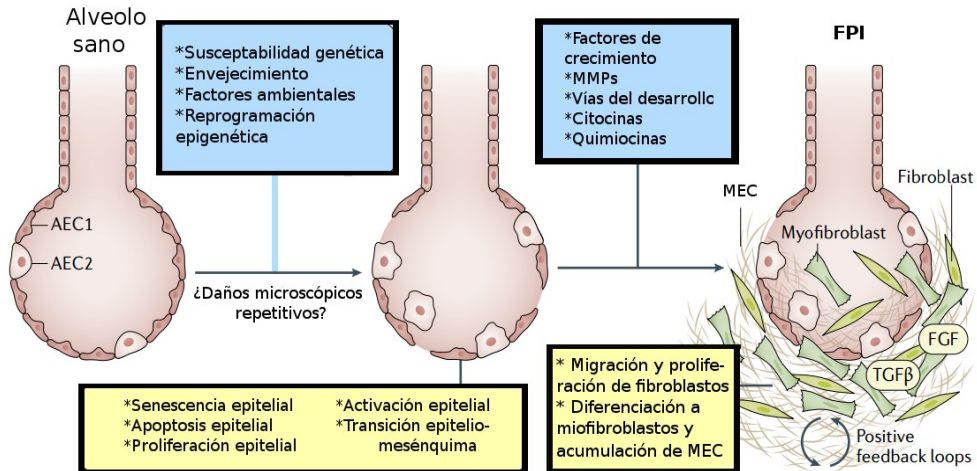


Figura 1. Modelo de la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). La integridad del epitelio se ve afectada por factores genéticos, epigenéticos, ambientales y procesos asociados a envejecimiento acelerado, con esto las células epiteliales se activan sintetizando mediadores como citocinas, quimiocinas, metaloproteasas de matriz (MMPs) y moléculas características de vías del desarrollo embrionario, que inducen la proliferación y migración de fibroblastos (fibroblasts) y miofibroblastos (myofibroblasts) quienes producen grandes cantidades de matriz extracelular (MEC). La MEC es un reservorio de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Tomada y traducida de Martínez et al, 2017.

Otra particularidad de la FPI es la activación de varias vías de señalización típicas del desarrollo embrionario como son Wnt, Sonic hedgehog (Shh) y Notch. La vía canónica de Wnt induce la proliferación de células epiteliales y secreción de moléculas profibróticas, TEM, migración de fibroblastos y diferenciación a miofibroblastos. La expresión de Shh por las células epiteliales está relacionada con proliferación, mientras que la constante activación de Notch evita la diferenciación epitelial y al eliminar la señal, se promueve la maduración epitelial hacia neumocito tipo II (King et al, 2011; Selman et al, 2016; Martínez et al, 2017).

Las cualidades de la MEC, como el módulo de Young, también contribuyen al comportamiento de los fibroblastos. Por ejemplo, células crecidas sobre matrices más rígidas se diferencian a miofibroblastos y aumentan la secreción de TGF β y colágenas, probablemente vía disminución de miR-29 (Martínez et al, 2017).

Dentro de las numerosas vías de señalización afectadas en la FPI, resulta consistente la desregulación en varias metaloproteasas de matriz (MMPs). Su posible participación en la

patogénesis y progresión de la enfermedad se revisó recientemente (Pardo et al, 2016). La migración de los fibroblastos hacia el espacio alveolar está favorecida por la ruptura parcial de las membranas basales gracias a la actividad de varias MMPs. Los neumocitos producen MMP1, -2, -3, -7, -9, -10, -13, -14, -15, -16, -19 y -24; mientras que los fibroblastos pulmonares se caracterizan por un incremento en la expresión de MMP2, MMP9 y MMP16 (King et al, 2011; Pardo et al, 2016).

Metaloproteasas de matriz

Las metaloproteasas son una subfamilia de proteasas que emplean un catión divalente en su sitio activo, principalmente zinc, para activar una molécula de agua que actúa como nucleófilo e hidroliza un enlace peptídico del sustrato. La mayoría de las metaloproteasas de matriz (MMP), también llamadas matrixinas, se secretan, otras se expresan como enzimas de superficie (MT-MMP, por *membrane type matrix metalloproteinase*) con dominio transmembranal o ancladas vía glucosilfosfatidilinositol, y además algunas pueden actuar intracelularmente (Hadler-Olsen et al, 2011).

La estructura general de las MMPs está compuesta por los siguientes dominios: un péptido señal, un prodominio con la secuencia conservada PRCGXPD en la que un residuo de cisteína interactúa con el ion de Zn^{2+} para mantener a la proteína como zimógeno, el dominio catalítico caracterizado por la secuencia HEXGHXXGXXHS, en donde los tres residuos de histidina unen el Zn^{2+} ; enseguida hay una región tipo bisagra rica en prolinas, y finalmente, un dominio tipo hemopexina que consiste de cuatro fragmentos organizados como pétalos, que determina la afinidad por el sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos (**fig. 2**) (Hadler-Olsen et al, 2011; Pardo et al, 2008; Sommerville et al, 2003).

En el ser humano existen 23 MMPs, las cuales en conjunto, pueden degradar todos los componentes de la MEC; asimismo, pueden actuar sobre sustratos que no son de la matriz, tales como: quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento y sus receptores, moléculas de adhesión celular, ligandos apoptóticos y factores angiogénicos. De esta manera, sus efectos son múltiples y contribuyen a la regulación de diversos procesos celulares (Pardo et al, 2008; Selman y Pardo, 2008). Las MMPs están reguladas principalmente a nivel transcripcional y controlando la activación de zimógenos, ya sea por acción de inhibidores endógenos, por proteólisis, o bien, por activación alostérica; además, algunas se activan intracelularmente por una proproteína convertasa como la furina (Hadler-Olsen et al, 2011; Sommerville et al,

2003).

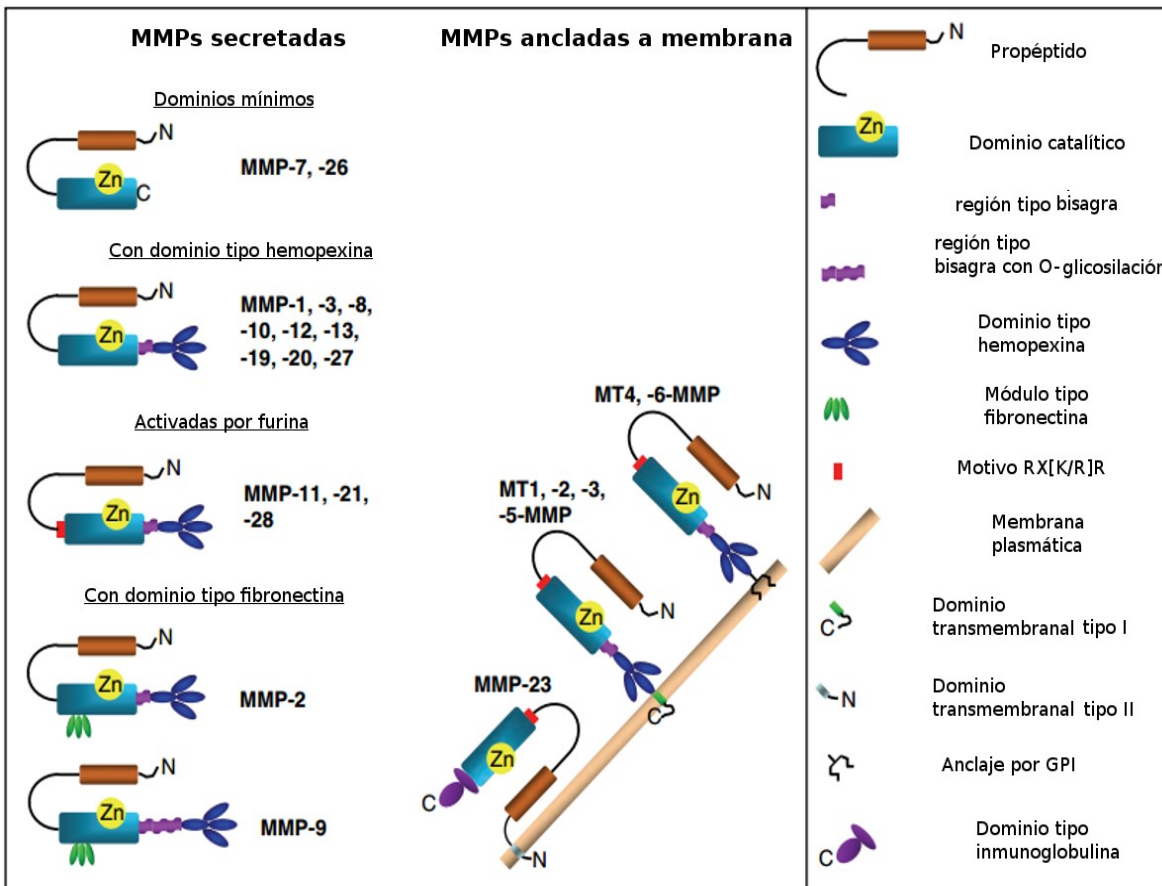


Figura. 2. Estructura de las metaloproteasas de matriz (MMPs). La mayoría de las MMPs contiene un prodominio, un dominio catalítico y un dominio tipo hemopexina. Las MMPs tipo membrana (MT-MMPs) pueden tener dominio transmembranal o estar ancladas mediante glucosilfosfatidilinositol (GPI). MT-MMPs, MMP-11, -19, -21 y -28 pueden ser activadas intracelularmente por propeptidinas convertidas como la furina. Tomada y traducida de Hadler-Olsen et al, 2011.

Como su nombre lo dice, las MMPs se describieron como enzimas que degradan la MEC; posteriormente, se encontraron sustratos no tradicionales, pero aún en el ambiente extracelular. Después de décadas de estudio, algunos sustratos intracelulares se empezaron a reportar (revisado por Cauwe y Opdenakker, 2010), e incluso nucleares (revisado por Mannello y Medda, 2012).

MMPs en FPI

Para entender el papel que desempeñan las MMPs en la fibrogénesis pulmonar se recurre a modelos animales y estudios con células *in vitro*. El modelo experimental más usado es el

del daño inducido por bleomicina instilada intratraquealmente en ratones de la cepa C57Bl/6, deficiente de la hidrolasa de bleomicina. Las recomendaciones más recientes sobre el modelo murino incluyen que la bleomicina sea administrada por vía orofaríngea para evitarle al animal el procedimiento quirúrgico y reducir así los periodos de anestesia y recuperación (Jenkins et al, 2017).

La FPI es una enfermedad progresiva, asociada al envejecimiento producto de la activación de células epiteliales, mientras que la fibrosis que desarrolla el ratón es consecuencia de un proceso inflamatorio, eventualmente se resuelve y frecuentemente se utilizan animales jóvenes de alrededor de ocho semanas de edad. Aunque el modelo murino no representa fielmente a la FPI, comparte algunos mecanismos fibrogénicos con el proceso en humano, por lo cual resulta muy útil para entender la patología, sobre todo cuando se tiene acceso a animales genéticamente modificados para evaluar la participación específica de una molécula (Jenkins et al, 2017; Pardo et al, 2016). A continuación se describe una síntesis de lo que se conoce sobre algunas MMPs en FPI y en modelos de fibrosis pulmonar.

La MMP7, que es el miembro de la familia más sobreexpresado en FPI, participa como mediador profibrótico degradando componentes de la membrana basal y procesando moléculas como ligando de FAS, integrina $\beta 4$, E-cadherina, plasminógeno, pro-TNF α y la proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina, entre otros (Morrison et al, 2009). Además, existe un asa de retroalimentación positiva entre MMP7 y osteopontina, las cuales son coexpresadas por células epiteliales alveolares en FPI (Pardo et al, 2005; Agnihotri et al, 2001). Asimismo, el ratón deficiente de MMP7 está protegido del daño inducido por bleomicina (Pardo et al, 2016).

Los ratones deficientes en MMP3 también están protegidos del daño inducido por bleomicina; además, la expresión de MMP3 en pulmones de rata, mediado por adenovirus, produjo aumento de fibrosis y acumulación de miofibroblastos. Asimismo, la estimulación de células epiteliales de pulmón con MMP3 activó genes blanco de β -catenina e indujo TEM (Yamashita et al, 2011).

Por otra parte, MMP19 participa como mediador antifibrótico. El ratón deficiente presenta una respuesta fibrótica exacerbada ante el daño inducido por bleomicina. Esta enzima está aumentada en células epiteliales hiperplásticas adyacentes a regiones fibróticas en comparación con células epiteliales normales, dichas células también sobreexpresan prostaglandina endoperoxido sintasa 2 (PTGS2 conocida también como COX2), la cual

también se ha descrito como protectora del proceso de fibrogénesis en el pulmón (Yu et al, 2012; Hodges et al, 2004).

Los fibroblastos pulmonares en condiciones normales no expresan MMP9, pero los de FPI sí la sintetizan, lo cual está relacionado con ausencia de la glicoproteína Thy-1 y activación de ERK1/2 mediada por TGF- β 1. Y nuevamente se tiene un asa de retroalimentación positiva, puesto que MMP9 es capaz de activar al TGF- β 1 latente (Hagood et al, 2005; Ramírez et al, 2011; Yu et al, 2000). Sin embargo, la sobreexpresión de MMP9 en macrófagos, disminuye la fibrosis inducida por bleomicina en el ratón; no obstante, no se observaron diferencias entre ratones silvestres (WT) y deficientes en MMP9 (Cabrera et al, 2007; Betsuyaku et al, 2000).

MMP28

El último miembro identificado de las MMPs es la MMP28. Dada su expresión prominente en epidermis y su actividad catalítica de proteólisis, se le llamó epilisina (Lohi et al, 2001). En el ser humano, el gen de la MMP28 se encuentra en el cromosoma 17, en el locus 17q11.2 (Marchenko y Strongin, 2001). Tiene ocho exones, puede dar lugar a tres variantes transcripcionales, la número 1 es la que codifica para la proteína completa de 520 residuos de aminoácido (aa). En cuanto a homología dentro de la familia de las MMP, la MMP28 se ubica más cercana a la MMP19 con un porcentaje de identidad a nivel de aa del 40% (Marchenko y Strongin, 2001). La proMMP28 pesa 58kDa y en su forma activa 48kDa (Illman et al, 2006).

La epilisina tiene un péptido señal de 22 aa que la caracterizan como enzima de secreción, seguido de un prodominio de 106 aa, el dominio catalítico de 156 aa, una región tipo bisagra de 36 aa y un dominio tipo hemopexina de 200 aa. La secreción de MMP28 es favorecida por furina quien reconoce como chaperona no proteolítica a los aa Tyr45-Leu46 localizados en la secuencia YGYL, conservada para todas las MT-MMPs, MMP19 y MMP28 (Lohi et al, 2001; Marchenko y Strongin, 2001; Pavlaki et al, 2011).

La MMP28 fue clonada de bibliotecas de cDNA de testículo y queratinocitos humanos, pero también se obtuvo de cDNA de pulmón tanto de etapa fetal como de adulto. Se expresa en diversos órganos como riñón, intestino, colon y páncreas en adulto; cerebro y músculo esquelético en etapas fetales, y en algunos tipos de cáncer como el ovárico, pancreático, el oral de células escamosas (OSCC) y en la línea celular A549 que corresponde a adenocarcinoma pulmonar (neumocitos tipo II) (Lohi et al, 2001; Marchenko y Strongin, 2001;

Lin et al, 2006).

Se sugirió que ayuda a la reparación de heridas en piel, donde se expresa en queratinocitos basales cercanos a heridas (Saarialho-Kere et al, 2002). Está aumentada en el cartílago de pacientes con osteoartritis y artritis reumatoide (Kevorkian et al, 2004; Momohara et al, 2004); así como en pacientes de cáncer gástrico y en varias líneas de la misma patología, correlacionando con menor supervivencia de los pacientes y mayor habilidad invasora de las células (Jian et al, 2011). Se propuso que podría participar en una cascada de proteasas asociada con algún activador presente en el suero fetal bovino, que llevara a la degradación de componentes de la membrana basal: colágena IV, laminina I y fibronectina (Heiskanen et al, 2009); sin embargo, no se encontró algo concreto en este sentido.

En ratón y rana se expresa durante el desarrollo y regeneración del sistema nervioso, antes de la mielinización. Es en este contexto donde se han descrito sus únicos sustratos fisiológicos: la molécula de adhesión celular neural (NCAM-1), *nogo A (neurite outgrowth inhibitor A)* y neuregulina (NRG1) (Werner et al, 2007). Asimismo, es capaz de degradar caseína, un sustrato común para otras MMPs (MMP1, -3, -7 -9, -10, -13, -19 y -27) (Lohi et al, 2001; Illman et al, 2008).

MMP28 protege líneas de células epiteliales pulmonares de apoptosis inducida por estaurosporina y el epitelio pulmonar del ratón deficiente es más susceptible a muerte inducida por influenza (Manicone et al, 2011). En el modelo de daño inducido por bleomicina se describió que el ratón deficiente de MMP28 desarrolla menos fibrosis pulmonar (Gharib et al, 2014). Recientemente se encontró que MMP28 también está implicada en el enfisema inducido por humo de cigarro (Manicone et al, 2017).

MMP28 en FPI

Un análisis de microarreglos señaló que la expresión génica de MMP28 estaba aumentada en pulmones de pacientes con FPI comparados con controles (Pardo et al, 2008). Para corroborar este resultado, se midió la expresión en nueve muestras de pacientes con FPI y tres controles, no se encontraron diferencias entre los grupos. No obstante, mediante inmunohistoquímica (IHC) se exploró qué tipo de células expresan MMP28 en FPI, encontrando que principalmente son las células epiteliales. Muchas células del epitelio alveolar de FPI presentaron una tinción predominantemente nuclear, mientras que en las

células del epitelio bronquial solamente se observó tinción citoplásmica. En los pulmones control prácticamente no hubo tinción positiva (Maldonado M, 2011).

Muchas proteínas entran al núcleo gracias a importinas que reconocen regiones ricas en aa cargados positivamente, estas secuencias se conocen como señales de localización nuclear (SLN). A propósito de la localización nuclear de MMP28, se realizó un análisis *in silico* con dos herramientas de software libre (*Predict Protein* y *NLStradamus*) y ambas arrojaron la misma probable SLN 112-RHRTKMRRKKR-122 al inicio del dominio catalítico (Maldonado M, 2011; Nguyen et al, 2009; Rost et al, 2004).

Las funciones asociadas a la expresión epitelial pulmonar de MMP28 no están descritas con precisión. Se desconoce si la probable SLN sea la responsable de que MMP28 entre al núcleo y su función en este compartimento. El análisis de estos aspectos funcionales y estructurales incrementará la comprensión de los complejos procesos de los que es responsable el epitelio alveolar aberrantemente activado en la FPI.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de MMP28 sobre diferentes funciones de las células del epitelio alveolar pulmonar así como examinar el proceso que lleva a esta enzima a su localización nuclear.

Objetivos específicos

1. Determinar la expresión de MMP28 en FPI
 1. En pulmón
 2. En suero

2. Analizar la localización de MMP28 mediante IHC y co-inmunofluorescencia (IF) con marcadores epiteliales

3. Estudiar localización nuclear de MMP28 en A549
 1. Corroborar localización nuclear por IF y western blot (WB).
 2. Determinar si su internalización en núcleo es mediada por la probable SLN.

4. Sobreexpresar el gen de interés en líneas celulares epiteliales alveolares (neumocitos tipo II) de humano A549 y de rata RLE-6TN, así como disminuir su expresión en A549 y en cultivo primario de células bronquiales basales, con el fin de evaluar el efecto de MMP28 en líneas celulares epiteliales sobre:
 1. Tasa de crecimiento
 2. Proliferación
 3. Apoptosis
 4. Transición epitelio-mesénquima
 5. Cierre de herida
 6. Transmigración

5. Evaluar si los efectos de MMP28 son dependientes de la actividad catalítica sobreexpresando una isoforma inactiva.

6. Analizar el papel de Mmp28 en modelo de daño inducido por bleomicina en ratones C57BL6 silvestres y Mmp28 ^{-/-} (KO).
 1. Determinar expresión de Mmp28 en ratones WT sin y con bleomicina.
 2. Cuantificar hidroxiprolina en ratones WT y KO.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de pulmones humanos

Todas las muestras se obtuvieron bajo protocolos aprobados por los Comités de Ética y todos los participantes dieron consentimiento escrito informado. Las muestras de la cohorte mexicana se obtuvieron del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER, Ciudad de México, México). Las muestras de Alemania se obtuvieron del biobanco del *Comprehensive Pneumology Center* por colaboración con Oliver Eickerlberg (CPC, Helmholtz Zentrum München, Alemania).

Bacterias y plásmidos

Para amplificar los plásmidos se empleó la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, puesto que

carece de sistema de recombinación; como medio de cultivo se utilizó LB líquido (BioRad) y LB agar (BioRad). El plásmido con la secuencia de MMP28 se compró a *Origene* (RC215325); así como, el vector control (pCMV6-Entry C-terminal Myc and DDK Tagged, PS100001, Origene). Estos vectores plasmídicos permiten ser multiplicados en *E. coli*, pero también son vectores de expresión en mamíferos. Tienen el origen de replicación ColE1 para un alto número de copias en bacterias; así como el gen de la fosfotransferasa de neomicina que permite selección de procariontes con kanamicina o de eucariontes con un análogo de la neomicina como G418 (geneticina). La MMP28 tiene una etiqueta en el extremo C-terminal compuesto por un fragmento de Myc (EQKLISEEDL) y por el péptido sintético conocido como Flag que Origene llama DDK (DYKDDDDK). Se prepararon bacterias competentes con CaCl₂, se transformaron con la técnica de choque térmico y los plásmidos se extrajeron mediante lisis alcalina. Se realizó digestión con XhoI. Los detalles se incluyen en el apéndice de protocolos.

Cultivo celular

La línea de células epiteliales alveolares de humano A549 y la línea de células epiteliales de rata RLE-6TN se compraron a la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células epiteliales alveolares tipo II de origen primario (donadas por Melanie Königshoff del CPC, Helmholtz Zentrum München, Alemania) y las células epiteliales bronquiales basales (BEC) se aislaron de regiones histológicamente normales sin tumores de un paciente al que se le practicaba una resección tumoral (colaboración con el CPC). Todas las células se cultivaron en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de aire.

La autenticidad de las células A549 se probó por perfil genético de repetidos cortos en tandem en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN, Mexico, Anexo 3). Las células A549 se crecieron en medio completo Ham's F12 (Gibco) con 5% de suero fetal bovino (Gibco). Las células RLE-6TN se crecieron en medio completo Ham's F12 (Gibco) suplementado con 0.01 mg/mL de extracto de pituitaria bovina, 0.005 mg/mL de insulina, 2.5 ng/mL de factor de crecimiento tipo insulina, 1.25 ug/mL de transferrina y 2.5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Las BEC se crecieron en BEGM (Lonza) con los complementos recomendados: epinefrina, ácido retinoico, extracto de pituitaria bovina, EGF, insulina, hidrocortisona, sulfato de

gentamicina, anfotericina B, transferrina y triyodotironina. Estas células se usaron siempre en pasaje 4.

Silenciamiento. Se siguió el protocolo para infección con partículas lentivirales control (shCtrl sc-108080, Santa Cruz) o con shMMP28 (sc-62278-V, Santa Cruz), vía polibrene (sc-134220, Santa Cruz).

Transfección. Se realizó lipofección con el compuesto lipoproteico Turbofectin (*Origene*). Se sembraron 150,000 células A549 o RLE en caja de 12 pozos. Al siguiente día se preparó el complejo turbofectina-DNA [1µg de plásmido (MMP28, KQ-MMP28, EA o Mock: RC215325 y pCMV6-Entry C-terminal Myc and DDK Tagged, PS100001 Origene) con Turbofectin (TF81001, Origene)]. Se dejó en el medio de cultivo F12 con 5% de suero 48 horas. Enseguida, las células se lavaron tres veces con PBS estéril y se mantuvieron en medio selectivo durante dos semanas. El medio selectivo con G418 para A549 se usó a 1.4mg/mL. En cambio el medio selectivo para RLE se usó con una concentración final de 0.1mg/mL, de acuerdo a las curvas que se prepararon para cada tipo celular seleccionando la menor cantidad de antibiótico con la que morían todas las células en una semana.

Silenciamiento de BEC. Se llevó a cabo transfección reversa, esto es, al momento de sembrar las células se les agregó el siRNA control (scrambled siRNA, AM4611, Ambion) o el de interés siMMP28 (s35627, Ambion) junto con Lipofectamina RNAiMAX (13778-150, Invitrogen). Se trató de silenciamiento transitorio por lo que cada experimento se realizaba añadiendo la misma concentración del siRNA correspondiente.

Diferenciación in vitro de BEC. Se utilizó el cultivo en interfase aire-líquido (ALI por sus siglas en inglés). Las células bronquiales basales se siembran en pozos especiales recubiertos con colágena I. Al tercer día se les retira el medio de la región apical, solamente lo reciben por la región basal. El medio especial para inducir la diferenciación (ALI medium-Pneuma Cult) se prepara con *PneumaCult-ALI Complete Base Medium*, antibiótico-antimicótico (Penicilina y estreptomina 10000U/mL), heparina (2mg/mL) y *Pneuma Cult ALI maintenance supplements*. Cada semana se les lava la región apical con solución amortiguadora Hanks (HBSS) para retirar las secreciones. Al día 28 se levantaron y fijaron para

inmunofluorescencia, o bien, se extrajo RNA o proteína.

Estímulos. Todos los estímulos utilizados se incubaron en medio F12 sin suero: TGF β -1: 5ng/mL. TNF α : 15ng/mL. Mitomicina C: 5ug/mL, 2h, lavar e incubar con medio completo.

Modelo murino

Se trabajó con la cepa de ratones C57/BL6 silvestre (WT) y deficientes de Mmp28 (KO). Los ratones los donó Anne Manicone de la *University of Washington* por colaboración. La generación de los ratones deficientes está descrito en Manicone et al 2009. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y con alimento *ad libitum* en el bioterio del INER cuyo Comité de Ética aprobó todos los experimentos desarrollados con ellos. La colonia se genotipó por PCR punto final de DNA genómico extraído de un fragmento pequeño de cola que se cortó al momento del destete (4 semanas).

Daño pulmonar inducido por bleomicina. Ratones de entre 8 y 10 semanas de edad se anestesiaron con pentobarbital sódico (Pisabental PiSA) 1:10. Se les instiló intratraquealmente 10 mg de sulfato de bleomicina (Cayman chemical) en 50uL de solución salina. Los controles solamente recibieron el vehículo. Se sacrificaron a los 14 o 21 días posteriores a la instilación de donde el pulmón izquierdo se destinó a cuantificación de hidroxiprolina y el pulmón derecho se fijó para análisis morfológico e inmunohistoquímica.

Cuantificación de hidroxiprolina. Los pulmones se homogenizaron en agua y se hidrolizaron con 1mL de HCl (concentración final 6N) durante 18h a 95°C. Una alícuota se incubó con reactivo de Ehrlich y cloramina T. Se cuantificó la concentración de hidroxiprolina en microplaca de acuerdo con Cabrera et al 2015. La absorbancias se leyeron a DO de 550nm. Los datos se obtuvieron por comparación con curva estándar y se expresan como microgramos de hidroxiprolina por pulmón.

Extracción de células epiteliales de pulmón. Se extrajeron células de pulmón de ratón con la técnica de selección negativa. Los animales se anestesiaron con avertín vía intraperitoneal. Se perfundieron los pulmones con solución salina estéril a través del ventrículo derecho. Los lóbulos pulmonares se incubaron para digestión con el kit enzimático de disociación de

pulmón (Miltenyi) en tubos Gentle MACS C 30min a 37°C, precedido y seguido de un ciclo de agitación en el disociador (MACS miltenyi). La suspensión celular se filtró con coladores de 100 y 40 µm. Se lisaron los eritrocitos. Se centrifugaron las células y se incubaron con perlas antiCD45 15min a 4°C. La suspensión se filtró por una columna (LS Columns 130-042-401 Miltenyi Biotec) y se colectó el filtrado (selección negativa). Esta nueva suspensión celular tiene una pureza de 85% de células epiteliales verificado por citometría de flujo (EpCAM positivas, CD45 y CD36 negativas).

Imaging

Los ensayos de inmunohistoquímica (IHC) se realizaron como se ha descrito previamente (Herrera et al, 2013), al igual que los de inmunofluorescencia (IF) (Staab-Weijnitz et al, 2015). La citometría de flujo confocal fue similar a lo que se ha publicado (George et al, 2006) con el equipo ImageStream® (Merck) y los datos se analizaron con IDEAS® Software (Merck). Los detalles se enlistan en el apéndice de protocolos.

Reacción en cadena de la polimerasa

Extracción de DNA genómico de cola de ratón. Cortar un trozo pequeño de cola e incubar en tubo de PCR con 75 uL de solución HOT-SHOT (NaOH 25mM y EDTA 0.2mM en agua), una hora a 99°C. Añadir 75 µL de solución amortiguadora de neutralización (Tris 40mM pH 7.4). Mezclar y almacenar en refrigeración o congelación.

El RNA se extrajo con TRIzol y se realizó la retrotranscripción con el Verso cDNA synthesis kit (Thermo Scientific) o para microRNAs con *EXIQON RT 203301 Kit* (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Las reacciones de mutagénesis dirigida se llevaron a cabo con el *QuikChange II XL-Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent). De acuerdo a las indicaciones del proveedor, pero con reacciones de la mitad del volumen indicado tal como se presenta en el apéndice.

Extracción y análisis de proteínas

Extracción de proteína de pulmón. Cuatro tejidos de pacientes con FPI y cuatro de donadores sanos de Alemania se homogenizaron con un microdismembrador (Sartorius) a temperatura de nitrógeno líquido. Por otra parte, muestras pulmonares de pacientes y sujetos

sanos de México y de ratones control o instilados con bleomicina, se maceraron a temperatura de hielo seco con un dismembrador manual. En ambos casos las muestras se resuspendieron en RIPA, se sonicaron y centrifugaron para extracción de proteínas.

Las células se incubaron con RIPA para obtener lisados totales, o bien, se sometieron al protocolo correspondiente para separar proteínas de núcleo y citoplasma (kit NE-PER, Thermo Scientific, 78833) o para obtener cinco fracciones (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, Thermo Scientific, 78840). El western blot se realizó como ya se ha descrito antes (Herrera et al, 2013). Para la inmunoprecipitación se siguió la técnica del CPC (Staab-Weijnitz et al, 2015). Para la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se utilizó el kit 9003 de Cell Signaling. Los detalles se describen en los protocolos.

Efectos funcionales

Antes de sembrar las células para los experimentos donde se evaluó el efecto funcional de MMP28, se sincronizaron con 72h en medio con suero (\rightarrow G0).

Tasa de crecimiento. Se estudió con el reactivo WST-1 (Roche). Se sembraron células en caja de 96 pozos. Alveolares a baja confluencia (~60%) y bronquiales a confluencia media (~80%). Los ensayos con alveolares se llevaron a cabo en medio con 1% de SFB. Cada 24h desde el día cero se incubaron las células a 37°C durante 1h en medio sin suero y reactivo WST-1. Para las alveolares se utilizaron 5uL de WST-1 en 100uL de medio. Para las bronquiales se usaron 10uL de reactivo WST-1 en 100uL de medio. La DO se midió a 450nm y como referencia 620nm. La tasa de crecimiento se calculó en porcentaje sobre el basal (día cero). Se realizaron al menos tres experimentos independientes por tipo celular por triplicado.

Proliferación. Se midió la proliferación celular con el reactivo CyQUANT (Thermo Fischer Scientific). Las células se sembraron igual que para los experimentos de tasa de crecimiento y también se llevaron a cabo en medio con 1% de SFB. Cada 24h se aspiró el medio de los pozos, se lavaron con PBS, se dejaron secar y se congelaron a -70 °C. Una vez que se juntaron los pozos del experimento completo se incubaron 10min a TA en agitación fuerte y cubiertos de la luz con el buffer de lisis 1x con CyQUANT GR. Se transfirió a una placa oscura y se leyó fluorescencia a 480 y 520nm. La proliferación se calculó en porcentaje

sobre el basal. Se realizaron tres experimentos independientes por tipo celular por triplicado.

Ensayo de cierre de herida. Sembrar células a 100% de confluencia: 500,000 A549/ pozo. 400,000 RLE/pozo (caja de 12). 200,000 BEC/pozo (caja de 24). Al siguiente día dibujar herida con una punta de micropipeta. Se tomaron fotografías con un microscopio invertido EVOS XL (Life Technologies) y se analizaron con el software ImageJ. Se realizaron tres experimentos independientes por cuadruplicado con cada una de las líneas celulares.

Migración en cámara Boyden. Tripsinizar células para levantarlas, detener reacción con DMEM + BSA al 5%. Contar y preparar solución de 1 millón/mL. Poner en la parte inferior entre 500 μ L de DMEM solo o DMEM con EGF (50ng/mL). A cada inserto añadir 300 μ L de células (300, 000 células). Incubar. Quitar medio de los insertos, con cuidado de no perforarlos, secar y retirar células con cotonete aplanado. Colocar insertos en caja nueva con 350 μ L de la solución de tinción (cristal violeta). Incubar 10 min TA. Lavar. Dejar secar al aire los insertos después de quitarles con cotonete limpio y aplanado toda el agua del rededor y de dentro. Cuidado de no perforar. Transferir insertos a caja con 200 μ L de solución de extracción de tinción por pozo. Incubar 10 a 20 min en agitador, fijar la caja con cinta. Transferir 100 μ L a una placa de 96 pozos y leer a 560 nm. Para los ensayos sobre colágena I la incubación fue de 18 h. Para los ensayos sobre matrigel la incubación fue hasta por 72 h.

Migración de células epiteliales pulmonares murinas de cultivo primario. Las células al momento de extracción se siembran en un pozo con recubrimiento de matrigel. Se dejan descansar por lo menos 24h. Se levantan las células, se lavan con PBS, se resuspenden en DMEM con BSA al 5% y se siembran 500,000 células por pozo Boyden recubierto con colágena I. En la cámara inferior se coloca DMEM sin suero con 100ng/ μ L de EGF de ratón. Tras 24h se evalúa la migración tiñendo con cristal violeta.

Ensayo de citometría para detectar apoptosis. Estimular epiteliales con 50mU de bleomicina (Bleolem) en F12 sin suero, 48hrs. Considerar que la bleomicina evita que continúen proliferando. Levantar células, lavar y teñir con anexina V-PE (556421 BD Biosciences) y/o 2 μ L de 7-aminoactinomicina D (7AAD, 559925, Biolegend). Leer en citómetro. Se utilizó un citómetro CANTO (BD Biosciences). Los resultados se analizaron con FlowJo software (Tree

Star, Inc). Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

ELISA

La concentración de MMP28 en suero se determinó por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA, SEB999Hu, Clone-Cloud Corporation, USCN, PRC). Las muestras se diluyeron 1:5 con PBS para que quedaran dentro del rango de la curva estándar que se preparó de 0.156 a 10ng/mL. Se siguieron las recomendaciones del fabricante. La curva de cada placa se preparó el mismo día del ensayo. Las muestras y la curva se incubaron 2h. La incubación con el sustrato TMB fue de 15min en la oscuridad. Se agregó la solución para detener la reacción con el sustrato y se leyó la absorbancia a 450nm. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C.

Estadística

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en tres ocasiones diferentes, a menos que se mencione lo contrario. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar, a menos que se indique otra cosa. Se aplicó ANOVA con ajuste Dunn o Tukey para comparaciones múltiples. Cuando se trataba de dos grupos se utilizó t de Student o U de Mann Whitney. En los análisis de curvas ROC (*Receiver-operating characteristics*), se eligió un valor de MMP28 para diagnóstico diferencial con base en los porcentajes de sensibilidad y especificidad, se calculó el área bajo la curva y la razón de momios (*odds ratio*). Se aplicó análisis de correlación Spearman entre la concentración de MMP28 en suero y datos de pruebas funcionales de los pacientes. Valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. Los resultados se analizaron con GraphPad Prism versión 5.

Anticuerpos

De abcam: ERp57 ab13506, cytokeratin 5 ab52635, fibronectin [IST-2] ab6435, MMP28 ab57724. De Sigma-Aldrich β -actin (ACTB) HRP-conjugated anti-ACTB. De Cell signaling lamin A/C (2032). De Biogenex E-cadherin AM390-10M. De Biolegend β -actin 622101. De GeneTex lamin A/C (GTX101127). De Santa Cruz: pan-cytokeratin sc-8018, proSPC sc-293169, Epylisin (MMP28) sc-515010 y Mmp28 (ratón) sc-367259. De EMD Millipore 05-806 Anti-phospho-Histone H3 (Ser10 pH3). De Life Technologies reactivos y anticuerpos secundarios fluorescentes: goat anti-rabbit AF568 A11011; donkey anti-mouse AF488

A11001; DAPI: NucBlue R37606. De Novus Biologicals: MMP28 NBP2-17314. De Origene: DDK, TA50011-100 and TA180144. De Amersham: anti-mouse and anti-rabbit. De Triple Point Biologics: RP1-MMP28, RP2-MMP28, RP3-MMP28, RP4-MMP28, SPA-MMP28. RP1-MMP28 se une al N-terminal, RP2-MMP28 se une a la región de prohormona convertasa al inicio del dominio catalítico, RP3-MMP28 se une a la región tipo bisagra, RP4-MMP28 se une al dominio tipo hemopexina; SPA-MMP28 contiene RP1, RP2, RP3 y RP4-MMP28. En la **figura 3** se presenta una caricatura de la región que reconoce cada anticuerpo en MMP28.

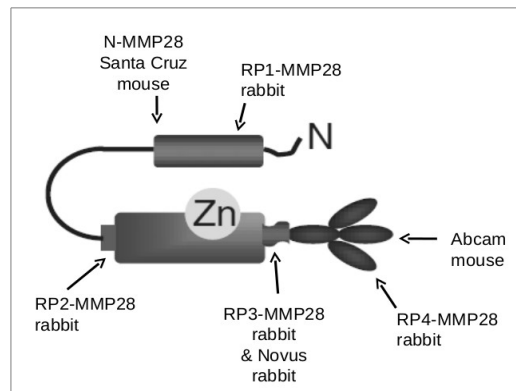


Figura 3. Anticuerpos anti-MMP28. Se utilizaron distintos anticuerpos hechos en conejo (rabbit) o en ratón (mouse) para identificar la proteína de interés. También se trabajó con SPA-MMP28 que es una mezcla de RP1, RP2, RP3 y RP4-MMP28.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos. Se utilizaron para PCR punto final (MMP28 y Plasmid) secuenciación de plásmidos (MMP28 y Plasmid), mutagénesis dirigida (EA SDM y KQ SDM) y PCR con sybgreen (MMP28sg amplifica todos los transcritos, MMP28tv2 es específico para el transcrito número 2).

Nombre	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
MMP28	CAGCTGGGACGACGTGCTGG	GCGTTTCAGGGCGCCTTCCT
Plasmid	GGACTTTCCAAAATGTCTG	ATTAGGACAAGGCTGGTGGG
EA SDM	GCTGGCGCACGCGATCGGTCACACGCTTGG CC	GGCCAAGCGTGTGACCGATCGCGTGCGCCA GC
KQ SDM	GACACCGGACCCAAATGAGGCGTCAGCAAC GCTTTGC	GCAAAGCGTTGCTGACGCCTCATTTGGGTCC GGTGTC
MMP28sg	AGGCGGAGGCATTCCTAGAG	CTGACAGGTAGCTGGGACAC
MMP28tv2	AGCTTAAAGGAGAGCAGAG	CCCTTGAAGAGGATGAG

RESULTADOS

Población de estudio

Para esta tesis se realizaron experimentos que se dividieron en tres categorías: a) aquéllos a partir de muestras de pacientes y controles, b) *in vitro* con líneas celulares y cultivos primarios, c) modelo de fibrosis pulmonar en ratón. De México y Alemania se obtuvieron biopsias pulmonares para extracción de RNA, proteína y cortes en parafina para análisis de IF. En la tabla 1 se resumen las características de los pacientes donadores para tales análisis. Los datos de los controles no se pueden dar a conocer por razones de confidencialidad.

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes con FPI donadores de biopsia pulmonar.

Pacientes de	México	Alemania
n	17	9
Sexo (M:F)	14:3	7:2
Edad (media \pm DE)	61.7 \pm 7.5	56.1 \pm 8.6

La expresión de MMP28 a nivel de proteína está aumentada en pulmones de FPI

Se analizó la expresión de MMP28 tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína en muestras de pulmones de pacientes de México y de Alemania (métodos). El análisis por western blot (WB) reveló bandas de entre 46 y 48 kDa correspondientes al peso molecular de la MMP28 activa, así como de 58 kDa correspondiente a la proMMP28 (**fig. 4A**). Por análisis densitométrico se determinó que la diferencia es significativa entre muestras control y de pacientes con FPI ($p < 0.01$, **fig. 4B**). Sin embargo, el análisis de PCR tiempo real no mostró diferencias a nivel del RNA mensajero (**fig. 4 C, D**).

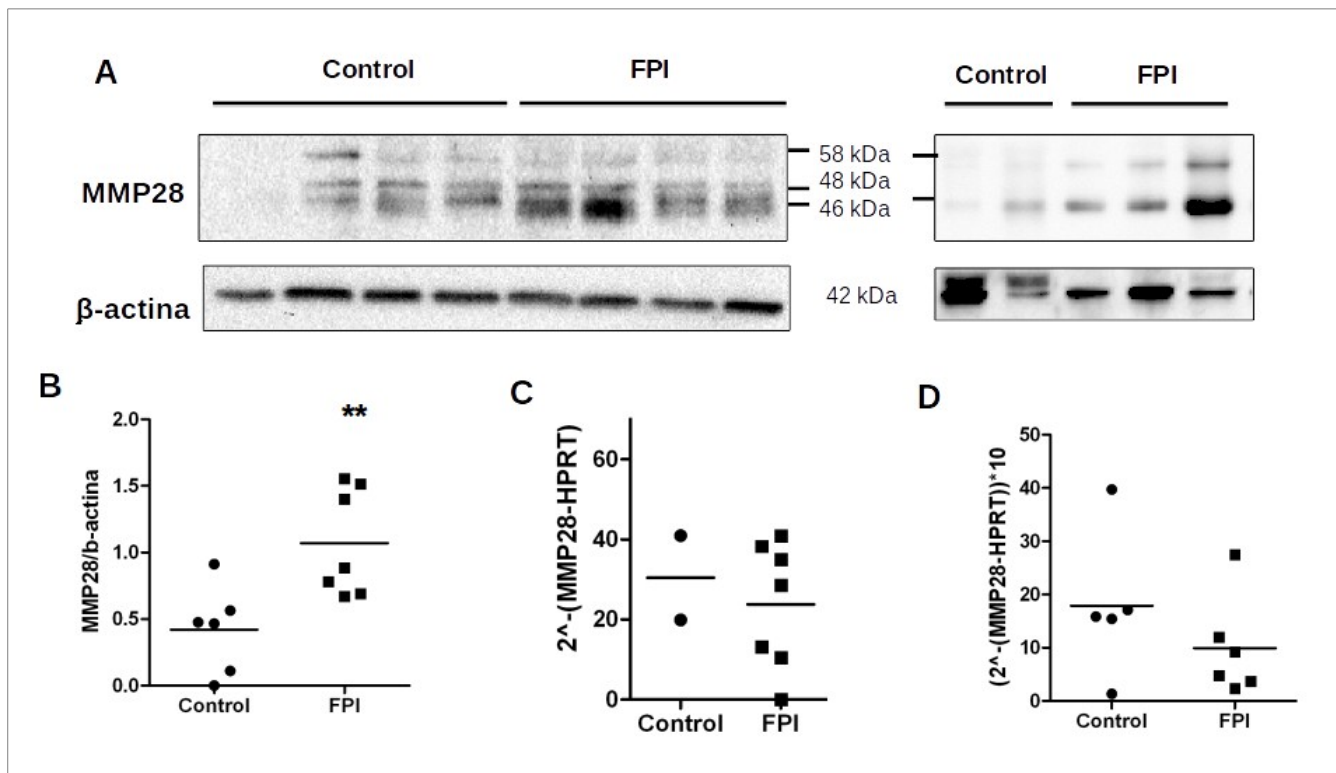


Figura 4. La MMP28 está aumentada a nivel de proteína en pulmones de pacientes con FPI. A. Western blot de muestras de México (derecha) y Alemania (izquierda). B. Densitometría de ambos WB ($p < 0.01$). C. qRT-PCR de muestras de donadores de México. D. qRT-PCR de muestras de donadores de Alemania. En C y D no hay diferencias significativas.

El nivel de mRNA no siempre correlaciona con el nivel de la proteína correspondiente. En este caso, las posibles vías de regulación para MMP28 podrían incluir mecanismos postranscripcionales y postraduccionales. Por ejemplo, degradación de la proteína o inhibición de su síntesis. Una posibilidad es un microRNA que pudiera estar impidiendo la traducción sin alterar el nivel de mRNA. A la fecha no hay microRNAs validados que tengan como blanco MMP28. Por lo que se llevaron a cabo dos búsquedas, por una parte se analizó en TargetScan (Agarwal et al, 2015) los posibles miRNAs que pudieran unirse a MMP28; por otra parte, se buscó cuáles de estos están disminuidos en FPI. De aquí se encontró que el miR20a-3p potencialmente se une al 3'-UTR de MMP28 y este mismo microRNA está disminuido en FPI (Oak et al, 2011).

La hipótesis era que miR20a podría evitar la traducción de MMP28 en el pulmón sano. Para ponerla a prueba se transfectaron transitoriamente células A549 con el mimic de miR20a y con un control. La qRT-PCR mostró que el nivel de miR20a efectivamente aumentó en las

células transfectadas, junto con una disminución parcial de MMP28 tanto a nivel de mRNA como de proteína (**fig. 5**).

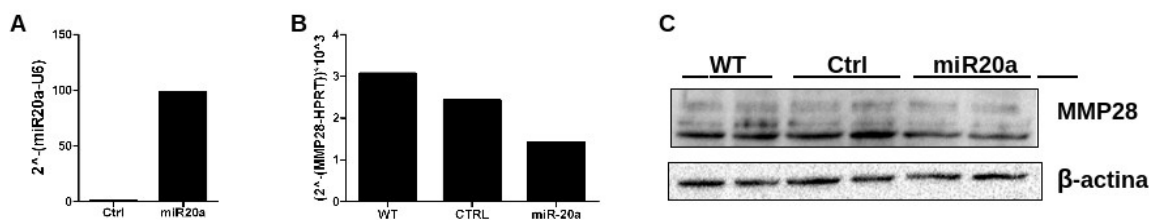


Figura 5. Relación entre MMP28 y miR20a. A. La transfección transitoria del mimic de miR20a aumentó más de cinco mil veces el nivel de miR20a 24h después de añadido al medio de cultivo. B. qRT-PCR de MMP28 en células transfectadas (24h). C. WB de lisados de células 48h post-transfección. Resultados representativos de dos experimentos independientes por duplicado. Diferencias no significativas.

Las células epiteliales de FPI expresan MMP28

En estudios previos se exploró mediante inmunohistoquímica (IHC) qué tipo de células expresan MMP28 en FPI, encontrando que principalmente son las células epiteliales (Maldonado M, 2011). Muchas células del epitelio alveolar de FPI presentaron una tinción citoplásmica y sobre todo nuclear (fig.6 D), mientras que en las células del epitelio bronquial solamente se observó tinción citoplásmica y apical (fig. 6 F).

El siguiente paso fue evaluar mediante inmunofluorescencia (IF) la localización con diversos anticuerpos para epilisina y con otros para marcadores de células epiteliales. En la figura 7 se presentan imágenes representativas donde se aprecia que las células con MMP28 en núcleo coexpresan queratina 5 (**fig. 7 B, C, E, F**), factor transcripcional tiroideo 1 (TTF1, **fig. 7, K, L**), o bien, pro-surfactante C (proSP-C, **fig. 7 N, O, Q, R**).

La queratina 5 se consideró como marcador de células bronquiales basales (Smirnova et al, 2016), pero es importante recordar que en FPI las células epiteliales activadas pueden expresar proteínas tanto de epitelios alveolares como bronquiales (Xu et al, 2016). TTF1 se ha utilizado previamente como marcador de neumocitos tipo II (Staab-Weijnitz et al, 2015).

La proteína proSP-C es sintetizada exclusivamente por células de epitelio alveolar tipo II por lo que es ampliamente utilizada como biomarcador de las mismas. Asimismo, se encontró que las células con MMP28 nuclear no expresaban ni estaban cerca de células positivas

para la proteína Club Cell 10-kDa (CC10) o para tubulina acetilada (acTub), marcadores de células diferenciadas de epitelio bronquial.

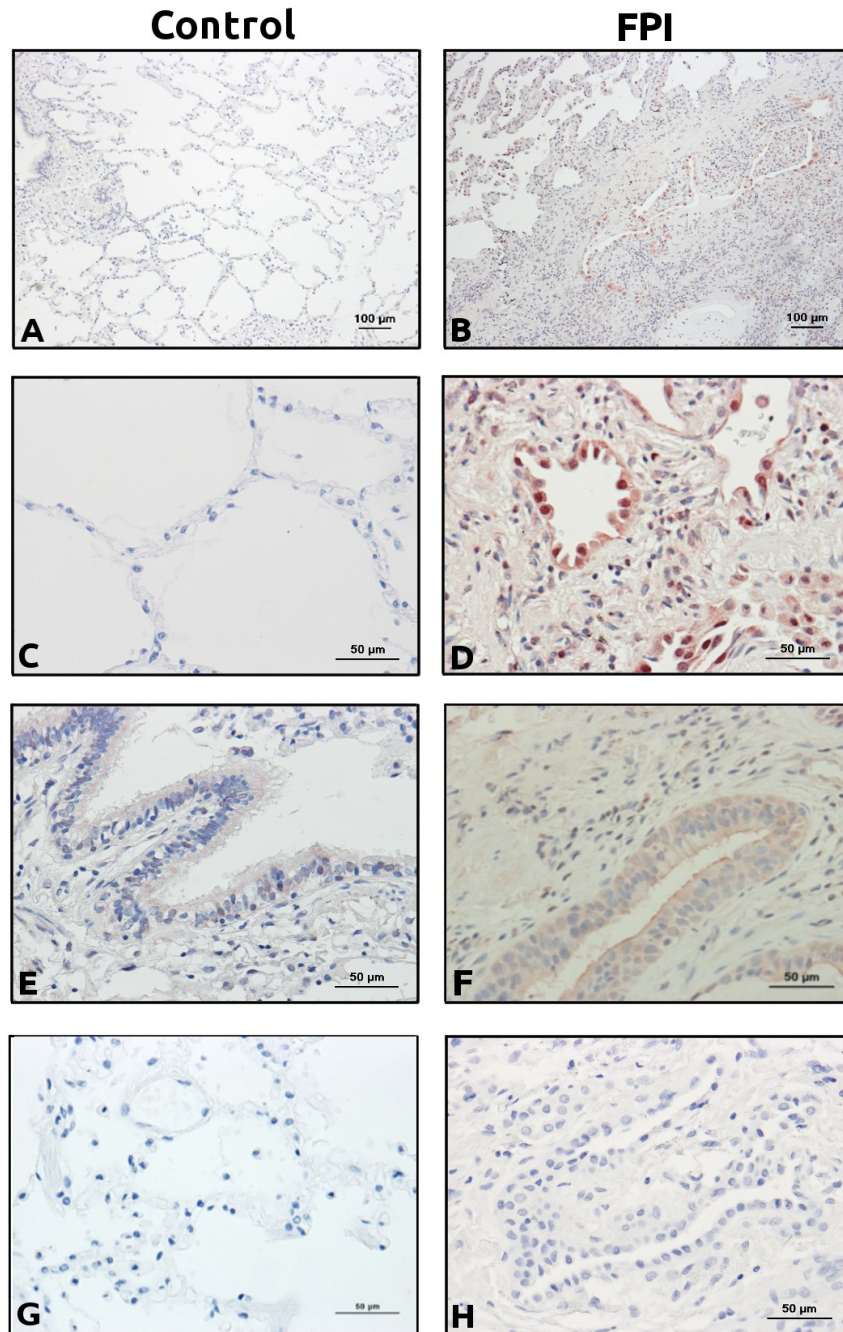


Figura 6. Las células epiteliales de pulmones de pacientes con FPI expresan MMP28. Inmunohistoquímica de pulmones control (A, C, E, G, n=5) o con FPI (B, D, F, H, n=8) con anti-MMP28 (Novus Biologicals). Los controles negativos no se incubaron con anticuerpo primario (G, H).

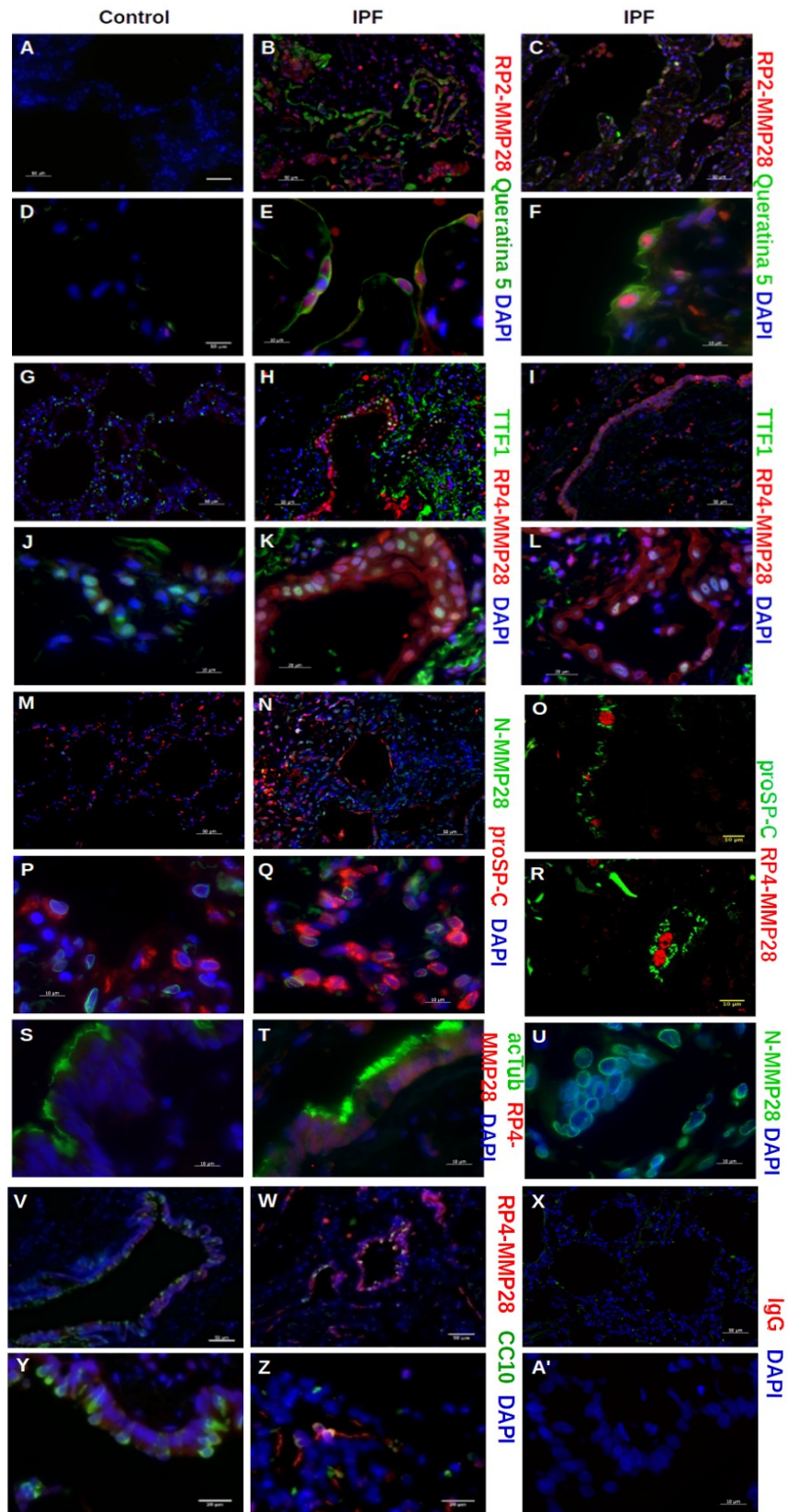


Figura 7. MMP28 es expresada por células epiteliales en FPI. Doble inmunofluorescencia de tejidos control (A, D, G, J, M, P, S, V, Y) y de pacientes con FPI (B, C, E, F, H, I, K, L, N, O, Q, R, T, U, W, X, Z, A'). Se utilizaron diferentes anticuerpos para MMP28, así como marcadores epiteliales: queratina 5, factor (TTF1), pro-surfactante C (proSP-C), tubulina acetilada (acTub) y proteína Club Cell 10-kDa (CC10). Los controles negativos se incubaron con IgG de conejo (X, A'). IPF n=5, Ctrl n=3.

Por otra parte, se observó que en el epitelio de bronquiolos, identificado por presencia de células que expresan acTub (marcador de células ciliadas, **fig. 7 S y T**) o por CC10 (marcador de células Club, **fig. 7 V, W, Y, Z**) y ausencia de TTF1 (**fig. 7 I**), MMP28 localiza principalmente en la zona apical y en el citoplasma.

La tinción nuclear se observó con diferentes anticuerpos dirigidos contra inicio de dominio catalítico, región tipo bisagra y dominio tipo hemopexina (RP2-MMP28, RP3-MMP28 y RP4-MMP28 de Triple Point y NBP2-17314 de Novus). Un anticuerpo dirigido contra el predominio (N-MMP28 de Santa Cruz) mostró tinción perinuclear (**fig. 7Q, U**).

Las laminillas se analizaron con un microscopio confocal por cortes en el eje Z que confirmaron que en algunas células la tinción estaba dentro de los núcleos (**fig.8 A, B**), mientras que en otras células la tinción era perinuclear (**fig. 8C**).

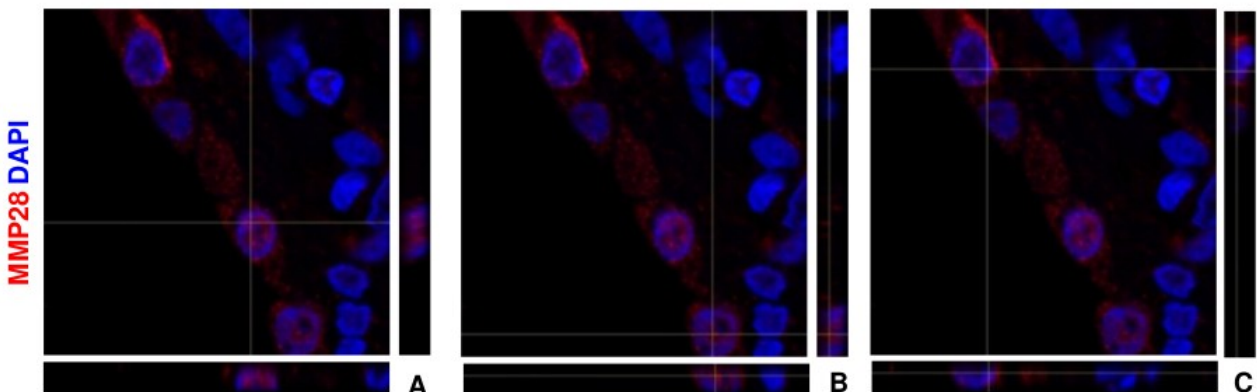


Figura 8. Imágenes de las vistas ortogonales de MMP28 nuclear en FPI. A y B. Ejemplos de células con señal positiva dentro del núcleo. C. Ejemplo de célula con señal positiva perinuclear.

Localización intracelular de MMP28 *in vitro*

Para evaluar si MMP28 puede estar en el núcleo de las células epiteliales pulmonares *in vitro*, se llevó a cabo IF de la línea celular A549, neumocitos de cultivo primario y células

bronquiales de cultivo primario (BEC) diferenciadas. En el caso de la línea celular A549, se encontró que muchas células presentaban señal citoplásmica, pero también algunas mostraban una evidente señal nuclear (fig. 9A), lo cual fue confirmado por cortes en el eje Z (fig. 9B). En algunos neumocitos de cultivo primario también se observó cierta señal nuclear (fig. 9C).

Por otra parte, las BEC, se diferenciaron durante 28 días con el modelo ALI (métodos) y se encontró que MMP28 no estaba en el núcleo, sino que estaba presente en el citoplasma y colocalizaba con la proteína de retículo endoplásmico ERp57 y no con la proteína de aparato de Golgi golgin97 (fig. 9 D-F). Estos resultados correlacionan con lo que se encontró en los tejidos.

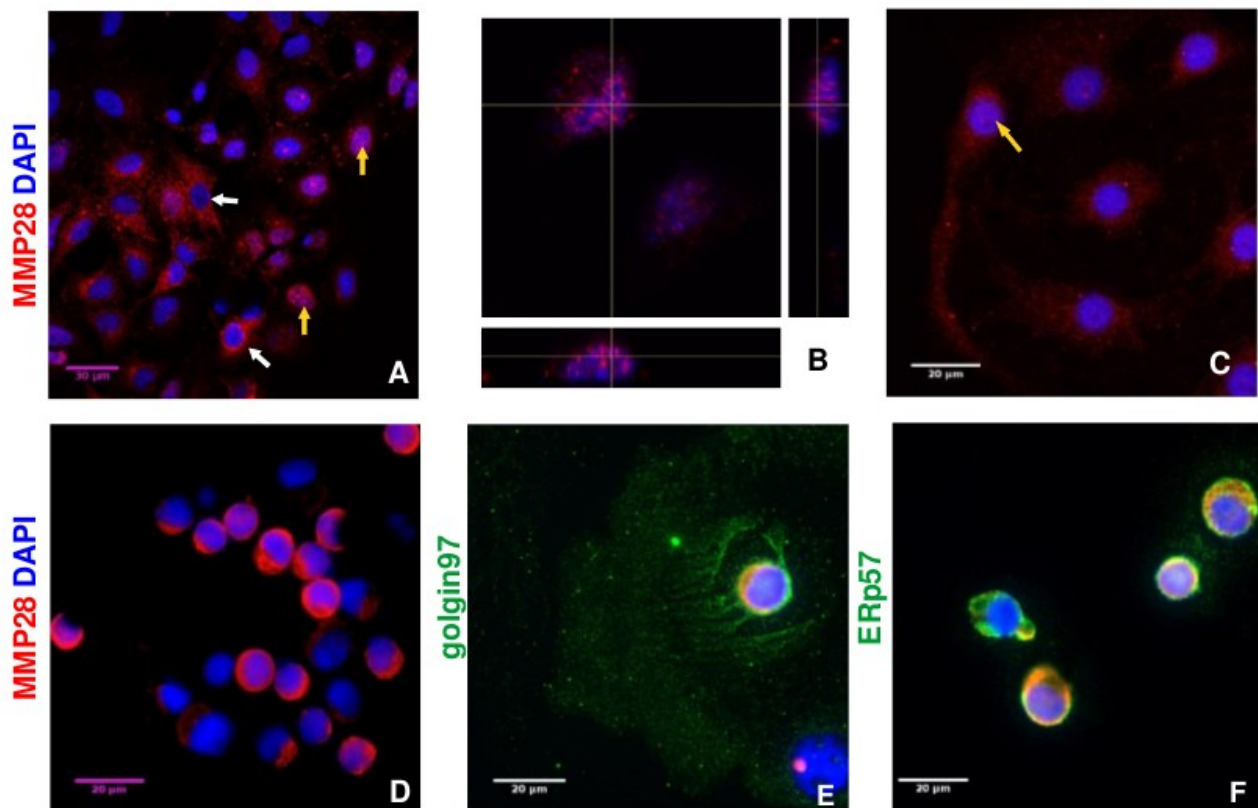


Figura 9. Inmunolocalización de MMP28 in vitro. A. Células A549 con localización de la enzima en citoplasma (flecha blanca) y en núcleo (flecha amarilla). B. Cortes en el eje Z a células A549. C. Cultivo primario de neumocitos de humano. D-F: Cultivo primario de células bronquiales diferenciadas *in vitro*. Co-inmunofluorescencia con golgin97 y disulfido isomerasa (ERp57).

Mecanismo de translocación nuclear

Para indagar si la localización nuclear de MMP28 depende de la probable SLN (112-RHRTKMRRKKR-122, Maldonado M., 2011), se llevó a cabo mutagénesis dirigida para cambiar las lisinas por glutaminas, que son aminoácidos de peso molecular muy parecido, pero sin carga (K116Q, K120Q y K121Q). Se transfectaron células A549 con esta mutante KQ-MMP28, con la original WT-MMP28 o con el vector vacío (Mock) y la localización de la enzima se analizó por citometría de flujo confocal (Métodos).

Las células se tiñeron con 7AAD que se une a DNA y con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 que se acopló a anti-MMP28 para localizar tanto la proteína endógena como la transfectada, o bien a anti-DDK para localizar únicamente la proteína transfectada. Como se muestra en la **figura 10**, aproximadamente 30% de las células Mock tienen MMP28 endógena en núcleo. En el caso de las células transfectadas el porcentaje de células con MMP28 nuclear sube a 45%. Cuando se analiza con anti-DDK, tampoco hay diferencia entre el porcentaje de células con enzima nuclear en la población de WT-MMP28 versus KQ-MMP28. Los resultados indican que mutar las lisinas por glutaminas en la probable SLN no afecta la localización de MMP28, por lo que probablemente esta secuencia no sea una SLN real y el mecanismo de translocación sigue siendo desconocido.

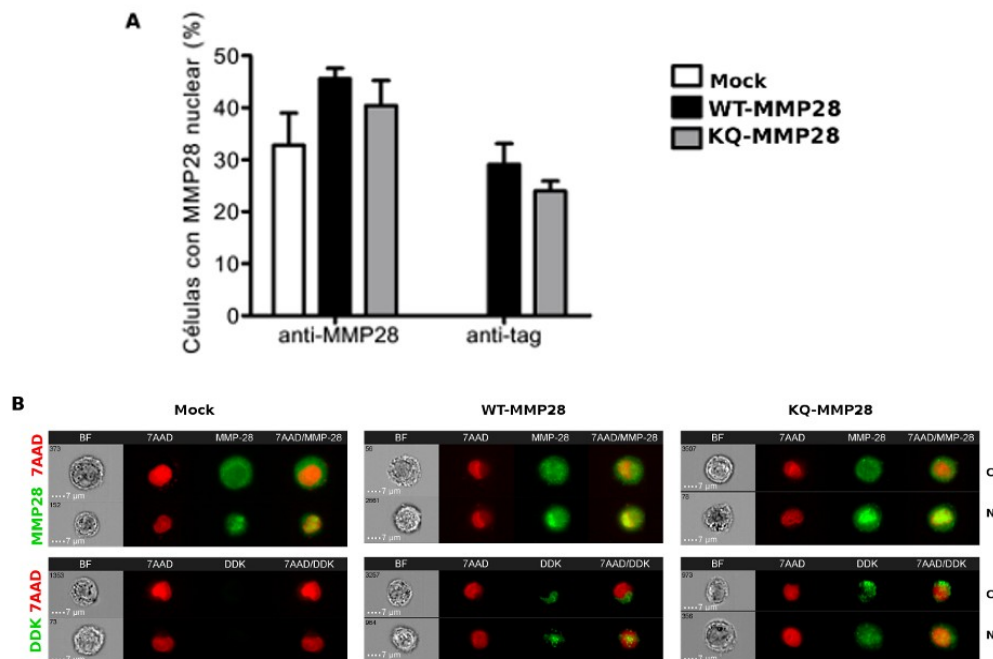


Figura 10. La localización nuclear no depende de las lisinas en la probable SLN. A. La gráfica muestra el porcentaje de células con colocación de MMP28 o DDK y DNA. Media de dos experimentos independientes \pm ES donde se adquirieron 5000 eventos (células únicas, ImageStream, ver métodos). B. Imágenes representativas obtenidas por citometría confocal mostrando localización de MMP28 (total con anti-MMP28 o transfectada con anti-DDK, en verde), en núcleo (N) o citoplasma (C). El DNA fue teñido con 7AAD (rojo). Entre WT-MMP28 y KQ-MMP28 no hay diferencias significativas.

Evidencia por WB de MMP28 nuclear

Para corroborar la presencia dentro del núcleo de la proteína, se obtuvieron fracciones de células A549. Por una parte se separó citoplasma y núcleo; por otra parte, se realizó un procedimiento que separó las células en cinco fracciones: citosol, extracto membranal (organelos membranosos y membrana plasmática), proteínas solubles nucleares, proteínas unidas a cromatina y citoesqueleto. Para mostrar la pureza de las dos fracciones se reveló contra lámina A/C y β -tubulina. Para mostrar la pureza de las cinco fracciones se reveló contra disulfido isomerasa (ERp57) y lámina A/C.

En términos generales se encontró MMP28 tanto en núcleo como en citoplasma. Se observó la banda correspondiente al zimógeno (62kDa) y a la forma activa (48kDa). Dependiendo del anticuerpo que se utilizara se veían más intensas unas bandas u otras. En ocasiones se encontraban ambas bandas en ambas fracciones, a veces en el núcleo sólo la forma activa, otras sólo la proMMP. Lo que fue consistente en todos los ensayos fue que el anticuerpo RP4-MMP28 reveló banda nuclear de epilisina activa y citoplásmica del zimógeno (**fig. 11**). Al tiempo que los anticuerpos que reconocen la región tipo bisagra, identificaron siempre la banda citoplásmica correspondiente a la MMP28 activa.

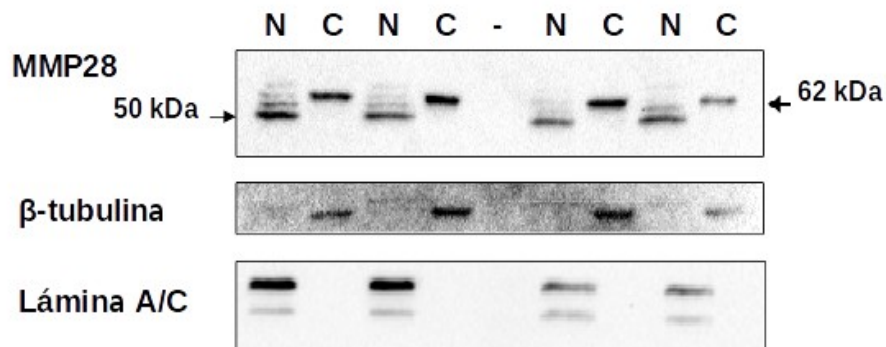


Figura 11. Evidencia por western blot de MMP28 en fracción nuclear. Se evaluó la localización en proteínas de núcleo (N) o de citoplasma (C). Se presentan resultados de dos experimentos independientes por duplicado revelados con RP4-MMP28.

Se probaron distintas variables y estímulos con el fin de encontrar las condiciones que indujeran la localización nuclear de la epilisina. Otras MMPs localizan en el núcleo después de un estímulo isquémico (Cuadrado et al, 2009; Kwan et al, 2004; Yang et al, 2010). La isquemia es la disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo, lo cual se traduce en una baja presión parcial de oxígeno (hipoxia), menos nutrientes disponibles y acumulación de desechos. De lo anterior, uno de los estímulos que se probó fue hipoxia en medio sin glucosa, seguida de reoxigenación en medio completo. La presencia nuclear de MMP28 (ya sea con banda de 37kDa o de 48kDa) se obtuvo en uno de cada dos experimentos incubando células 90min en DMEM sin glucosa ni piruvato seguidos de 24h en medio completo. Después de evaluar disponibilidad de nutrientes, concentración de oxígeno, etapa de ciclo celular, TGFβ1, recubrimiento de la caja de cultivo, entre otros, se concluyó que ninguno de estos estímulos es capaz de inducir la localización nuclear de MMP28. No obstante, se encontró que la expresión aumenta cuando las células se crecen sobre colágena I.

Al separar en cinco fracciones, la mitad de las veces se observó MMP28 en el extracto citosólico, el 100% de las veces tanto en el membranal como en el de proteínas solubles nucleares y nunca en el de citoesqueleto. En ocasiones se encontró una banda de alrededor de 37 kDa. Cuando las células se separaron en dos fracciones se observó fundamentalmente en la fracción nuclear, mientras que cuando se separaban en cinco se observó únicamente en la fracción de proteínas unidas a cromatina.

Revelando el blot por separado con los anticuerpos que reconocen los distintos dominios, resultó que la isoforma de MMP28 de 37 kDa no es reconocida por aquéllos que se unen a los dominios C-terminal. Se pensó que esta banda podría ser resultado de: a) corte C-terminal de la MMP28 completa, la que se ha estudiado hasta ahora que es producto del transcrito 1, o b) síntesis a partir del transcrito 2. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para el transcrito 2 y en dos experimentos independientes, las muestras no amplificaron. Por lo que se cree que se trató de una modificación al producto del transcrito 1.

Como se observaron bandas en la fracción de proteínas unidas a cromatina, se quiso realizar ChIP-seq para encontrar secuencias blanco de MMP28 donde pudiera estar actuando como cofactor transcripcional. Se llevaron a cabo dos intentos por duplicado de inmunoprecipitar (IP) la cromatina asociada a MMP28. La estrategia consistía en fijar interacciones DNA-proteínas, IP MMP28, liberar el DNA, corroborar en un gel la presencia de DNA y repetirlo para enviar a secuenciar el material obtenido.

En un primer intento se observó una tenue banda de DNA; sin embargo, en ese primer intento la cromatina no fue sonicada adecuadamente. En un segundo intento, la cromatina se sonicó apropiadamente en fragmentos de 100 a 200pb; no obstante, aunque en el segundo intento fue evidente la cantidad de DNA inmunoprecipitada con anti-MMP28, también se obtuvo DNA en el control negativo.

Simultáneamente se procedió a IP MMP28 con el objetivo de aislar la forma nuclear y analizar por espectrometría de masas las proteínas con las que interactúa y de esta manera empezar a pensar en el papel que desempeña en este organelo. Se separaron células A549 en cinco fracciones y cada una de ellas se sometió a IP con distintos anticuerpos. Tanto del ME, NE como del CB, se obtuvieron bandas que parecían ser la MMP28 activa (48kDa); además, en el carril de IP con IgG no se observaron bandas. Se repitieron las IP revelando el blot correspondiente con un anticuerpo secundario que se une solamente a las cadenas ligeras del anticuerpo primario, de donde se vio que las bandas ya no aparecieron, se trataba de las cadenas pesadas de los anticuerpos primarios, por lo que las condiciones de IP no fueron apropiadas. Asimismo, se intentó con el anti-DDK sin éxito.

Expresión de MMP28 durante diferenciación de BEC

Es posible inducir la diferenciación *in vitro* de las células bronquiales basales de cultivo primario con el modelo ALI. Se midió la expresión de MMP28 a nivel de RNA a lo largo del modelo en 4 líneas diferentes y se encontró un aumento significativo a los siete días de diferenciación (**fig. 12 A**). Para corroborarlo se repitió con una línea de donde se obtuvo RNA y proteína. En los paneles B y C de la **figura 12** se puede apreciar que la expresión de MMP28 aumentó a lo largo del modelo tanto a nivel de RNA como de proteína (lisados). El WB de la solución amortiguadora Hanks (HBSS) muestra una disminución en la secreción de la enzima al medio.

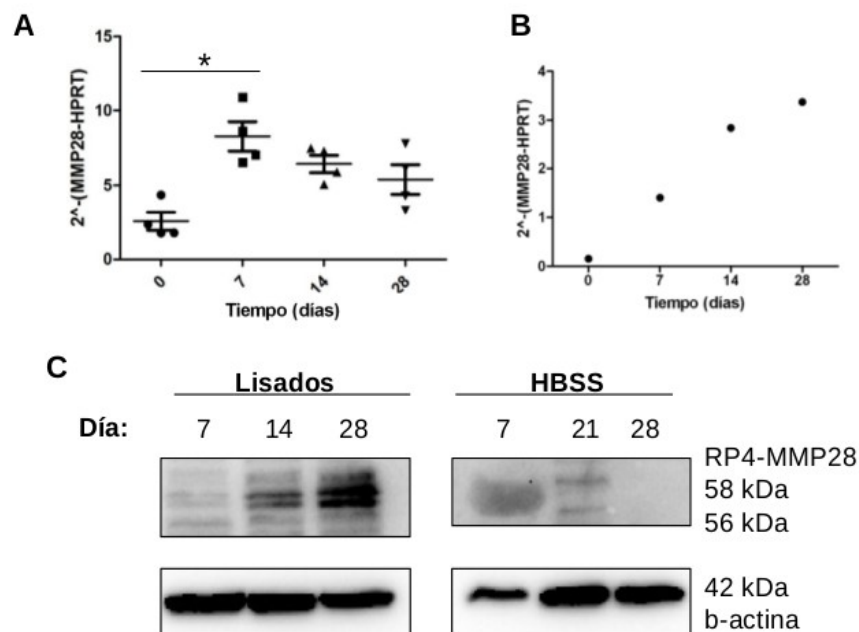


Figura 12. La expresión de MMP28 aumenta en células bronquiales en proceso de diferenciación. A y B: qRT-PCR de células bronquiales en modelo ALI. C: WB de lisados y secreciones celulares (recuperadas con HBSS) de células bronquiales en modelo ALI.

Sobreexpresión y silenciamiento de MMP28

Los plásmidos a transfectar se amplificaron en bacterias DH5 α . Para ello se prepararon bacterias competentes con la estrategia de cloruro de calcio, se transformaron con la técnica de choque térmico, se seleccionaron en LB con 20 μ g/mL de kanamicina, se creció una colonia correspondiente a cada plásmido, éste se obtuvo por lisis alcalina y se purificó con columnas.

Los plásmidos purificados se sometieron a digestión con XhoI para verificar su longitud. En la **fig. 13A** se puede observar que el plásmido con MMP28 abierto tiene una banda entre 6 y 8 kb, se esperaba de 6.4 kb. Mientras que el vector control (4.9kb) casi coincide con la banda del 5kb del marcador. Los plásmidos cerrados, es decir, que se incubaron sin enzima, se observan más arriba en el gel, aparentando un mayor tamaño.

Se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos para regiones del vector que en aquél con el gen de interés darían un producto de 1969 pb y en el control, uno de 447 pb. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1% teñido

con bromuro de etidio (**fig. 13B**). Se observan los productos del tamaño esperado. Además, se realizó PCR punto final para MMP28, en el panel **C** de la **figura 13** se presenta el gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se corrieron los productos de la reacción. Se observa la banda de 150 pb que corresponde al producto de PCR.

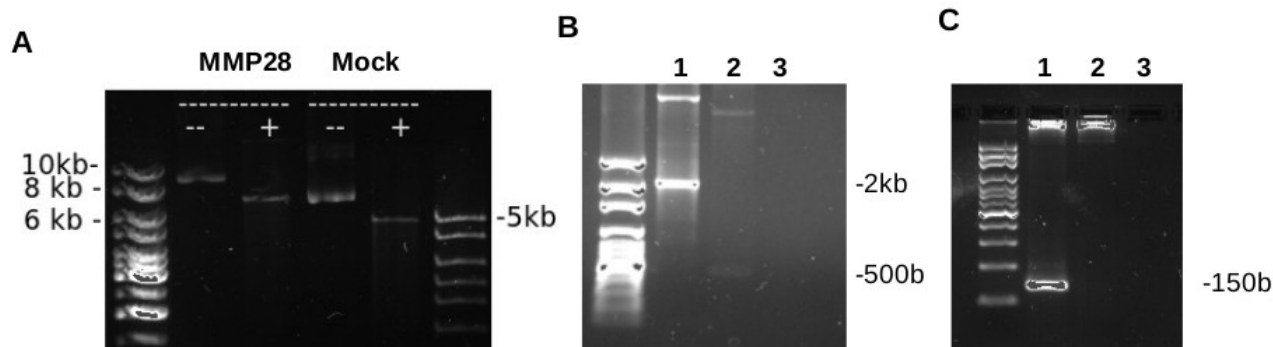


Figura 13. Características de los plásmidos purificados. A: Digestión de plásmidos con XhoI. B: PCR punto final con oligonucleótidos dirigidos al plásmido. C: PCR punto final con oligonucleótidos dirigidos a MMP28. B y C: carril 1: MMP28, carril 2: Mock (vector vacío), carril 3: control negativo.

Se trabajó con dos líneas celulares de neumocitos y cultivo primario de BEC. Las líneas de neumocitos tipo II de humano A549 y de rata RLE-6TN se transfectaron con la WT-MMP28 con la etiqueta DDK en el extremo C-terminal (MMP28). Utilizando un anticuerpo anti-DDK fue posible distinguir la MMP28 transfectada de la MMP28 endógena. Es importante señalar que el fragmento de Myc en la etiqueta, no representa una SLN. En la **figura 14** se muestra la sobreexpresión a nivel de RNA mensajero y de proteína. Además, la línea A549 se silenció con partículas lentivirales con shRNA (shMMP28) alcanzando 80% de disminución de la expresión a nivel de RNA mensajero y 70% de disminución a nivel de proteína en una de las clonas (**fig. 14 C-D**). En el caso de las BEC (**fig. 14 G-H**), se prefirió silenciamiento transitorio con siRNA (siMMP28) alcanzando 85% de disminución a nivel de proteína en las primeras 24h de cultivo y manteniendo 70% de eficiencia a las 72h. Similarmente, se intentó transfectar la línea de células bronquiales HBE4-E6/E7; sin embargo, a pesar de que se encontró el aumento en la expresión a nivel de mRNA, la proteína no se sintetizaba, por lo que no se continuó trabajando con estas células.

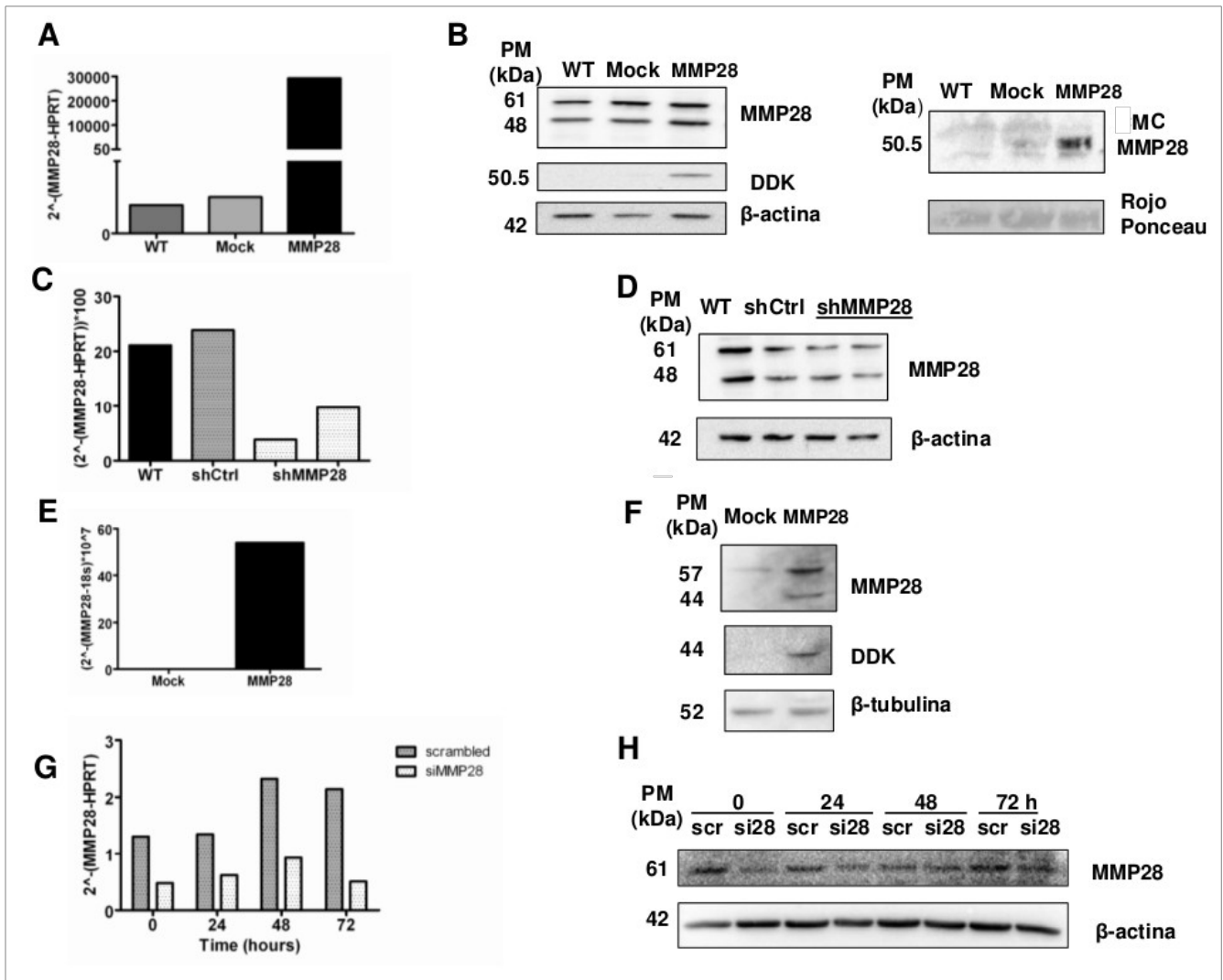


Figura 14. Sobreexpresión y silenciamiento de MMP28 *in vitro*. A y B: qRT-PCR y WB de A549 transfectadas. C y D: qRT-PCR y WB de A549 silenciadas con shRNA. E y F: qRT-PCR y WB de RLE transfectadas. G y H: qRT-PCR y WB de BEC primarias con siRNA con secuencias aleatorias (scrambled, scr) o dirigidas contra MMP28 (si28). DDK: etiqueta C-terminal en MMP28. MC: medio condicionado.

MMP28 aumenta la tasa de crecimiento y proliferación

Como se muestra en la **figura 15**, la sobreexpresión de MMP28 aumentó de manera significativa las tasas de crecimiento y proliferación ($p < 0.001$), tanto en neumocitos de humano como de rata. Cuando se silenció, las tasas de crecimiento y proliferación

disminuyeron con respecto a sus controles ($p < 0.001$) tanto en células alveolares como bronquiales.

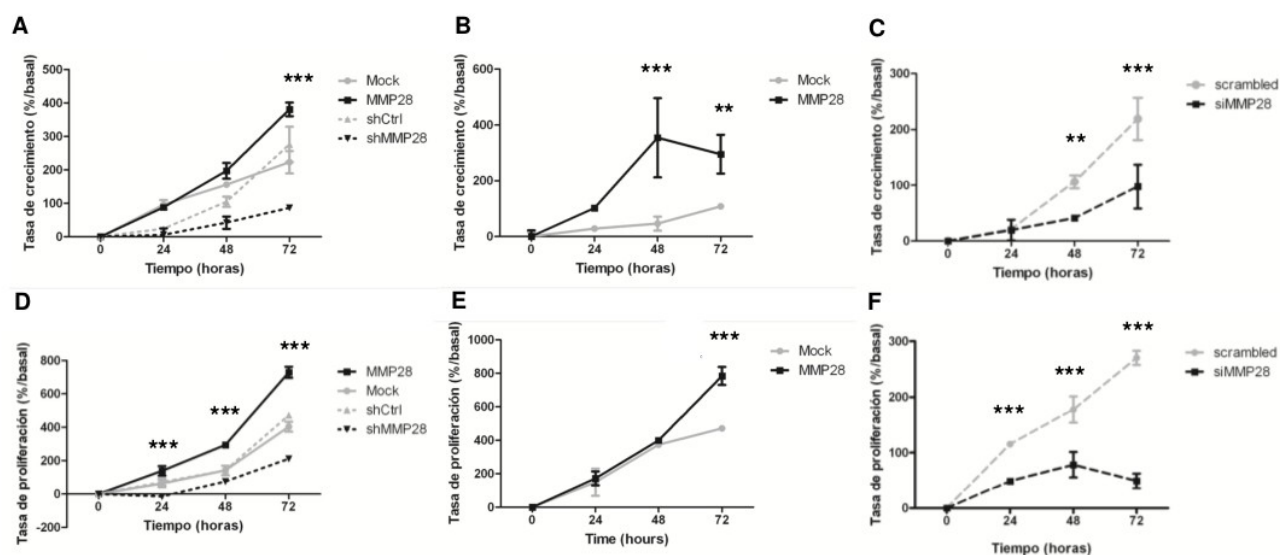


Figura 15. MMP28 aumenta la proliferación. Tasa de crecimiento medida con el reactivo WST-1 en células A549 (A), RLE (B) y BEC (C). Tasa de proliferación obtenida mediante el reactivo CyQUANT en células A549 (D), RLE (E) y BEC (F). Se presenta un representativo de al menos tres experimentos independientes por cada tipo celular por triplicado (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Tomando en cuenta este resultado se decidió revisar si en los tejidos se encontraría alguna marca de proliferación en células positivas para MMP28. Efectivamente se encontraron zonas donde colocalizaban en núcleo MMP28 e histona H3 fosforilada en la serina 10, la cual está relacionada con ciclo celular activo (**fig. 16**).

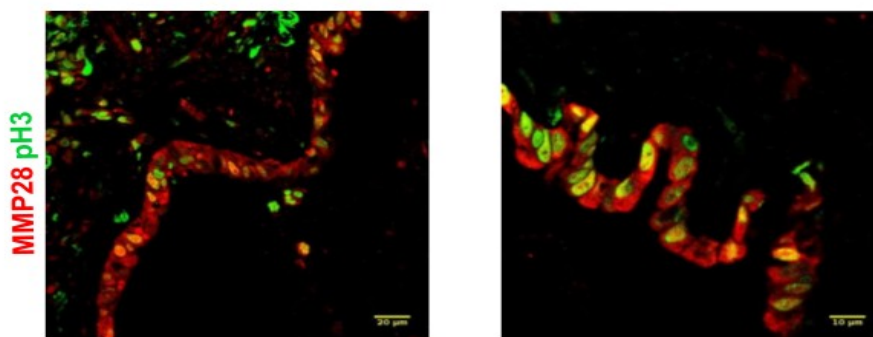


Figura 16. Colocalización de MMP28 y fosfo histona H3 (pH3). Imágenes de IF de tejidos de FPI con anti-MMP28 y anti-pH3.

MMP28 protege de apoptosis

Considerando que la tasa de crecimiento incluye la proliferación y la muerte, también se evaluó el efecto de MMP28 en la apoptosis usando como estímulo bleomicina. La sobreexpresión de MMP28 protegió a las células alveolares de manera significativa ($p < 0.05$), mientras que el silenciamiento resultó en un aumento de externalización de fosfatidilserina ($p < 0.01$) (**fig. 17 A**)

MMP28 favorece la transición epitelio a mesénquima

Los reportes previos sobre la posible participación de MMP28 en la TEM son contradictorios (Illman et al, 2006; Manicone et al, 2011). En este caso no se observó como tal una TEM espontánea en las células sobreexpresando MMP28, pero sí se encontró que la expresión de E-cadherina (típicamente usado como marcador epitelial) era menor con respecto a las células Mock (vector vacío) en condiciones basales. Cuando las células se estimularon con TGF β 1 para inducir la TEM, este efecto se potenció. Como marcador mesenquimal se estudió la proteína fibronectina, cuya expresión a los cuatro días de estímulo fue mayor en las células que sobreexpresan MMP28 (**fig. 17 B**). Por otra parte, se exploró si el silenciamiento afectaba la TEM. Las células se estimularon con 5ng/mL de TGF- β 1 por 1, 2, 3 o 4 días y no se encontraron diferencias ni en la disminución de E-cadherina (**fig. 17 C**) ni en la aparición de fibronectina.

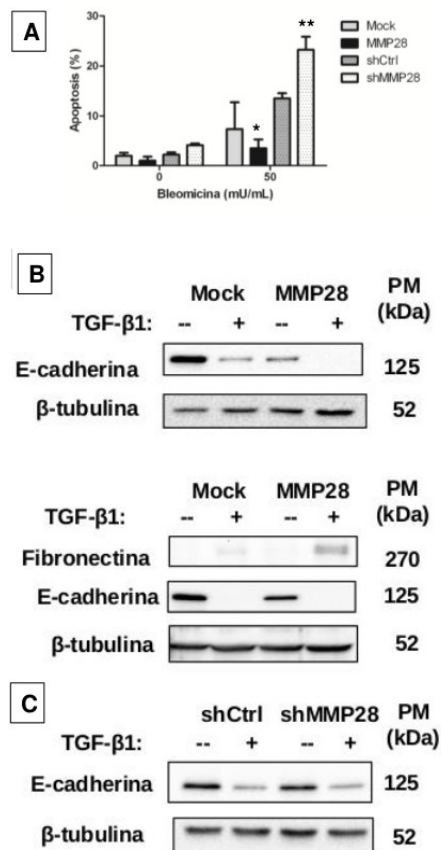


Figura 17. Otros efectos de MMP28. A. Porcentaje de células en apoptosis temprana medido por citometría de flujo (positivas para Anexina V y negativas para 7AAD). La gráfica muestra medias \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). B. Células Mock y +MMP28 se estimularon con TGF- β 1 por 2 (arriba) o 4 días (abajo). C. Células shCtrl y shMMP28 se estimularon

con TGF- β 1 por 24h. Se midió E-cadherina como marcador epitelial y fibronectina como marcador mesenquimal. B y C: WB representativos de tres experimentos independientes.

MMP28 promueve la migración

La migración se estudió con el ensayo de cierre de herida y con transmigración en cámaras Boyden. La sobreexpresión de MMP28 aceleró el cierre de herida tanto en A549 como en RLE; además, el silenciamiento lo retardó tanto en A549 como en BEC comparando con sus controles (**fig. 18**). Los tiempos varían porque se llevaron a cabo en distintas placas.

En este ensayo las células se siembran a confluencia y después de hecha la herida artificial, éstas proliferan y migran para cubrir el espacio. Se llevó a cabo un ensayo de cierre de herida donde se utilizó mitomicina C para inhibir la proliferación y evaluar solamente el efecto sobre la migración. La mitomicina C bloquea el ciclo celular en distintas etapas, según la dosis puede inhibir la proliferación o inducir apoptosis. En el panel **D de la figura 18** se muestran imágenes representativas donde se evidencia que las células que sobreexpresan MMP28 fueron capaces de cerrar la herida al tercer día, a diferencia de las Mock.

Con ensayos de transmigración en cámaras Boyden recubiertas de colágena I, se encontró que la sobreexpresión de MMP28 en A549 aumentó la transmigración mientras que el silenciamiento de MMP28 la disminuyó (**fig. 18 E**). Similarmente, se llevaron a cabo ensayos de migración en matrigel; sin embargo, las células A549 no migraron, no degradaron el matrigel. Incluso dejando las células 72h con EGF y suero fetal bovino al 10% como quimiotrayantes.

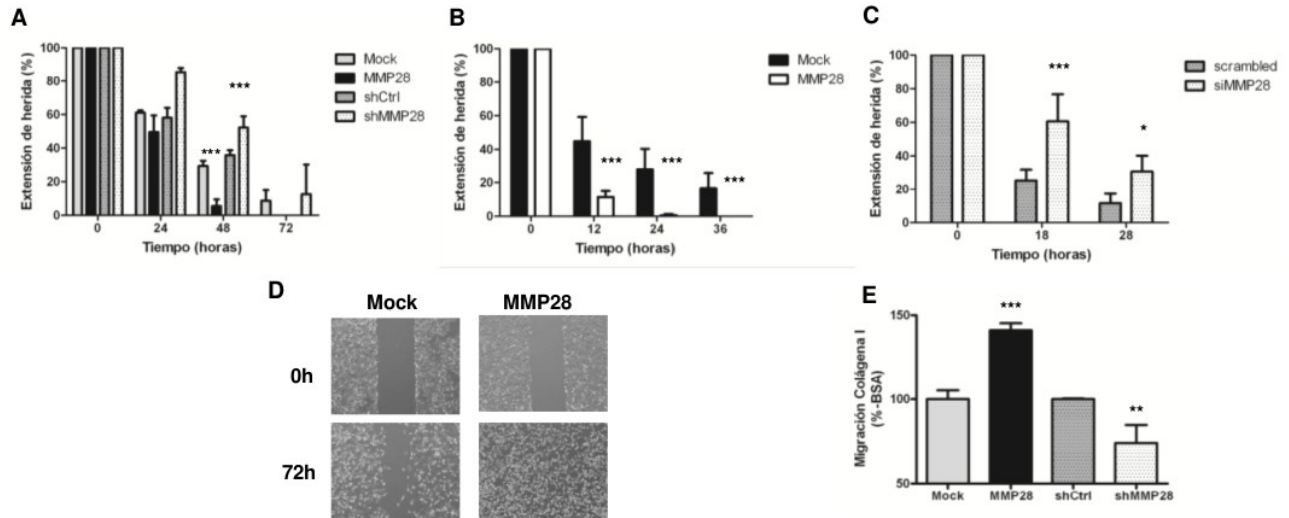


Figura 18. MMP28 promueve la migración. Ensayo de cierre de herida con A549 (A), RLE (B), BEC (C) y A549 con mitomicina C (D). Transmigración en cámara Boyden (E). A, B y C, representativo de cuatro experimentos independientes por cuadruplicado. D y E, representativo de dos ensayos por triplicado (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Los efectos de MMP28 dependen de su actividad catalítica

Para saber si los efectos funcionales se deben o no a la actividad catalítica de MMP28, con base en Illman et al, 2006 y Manicone et al, 2011, se llevó a cabo mutagénesis dirigida al glutamato en el sitio catalítico (E241A). Las líneas celulares de humano y rata se transfectaron con esta mutante EA y se repitieron experimentos encontrando que el incremento en la tasa de crecimiento y en la tasa de proliferación, así como el cierre de herida acelerado no se conservaron en la mutante EA. Por lo tanto, estos efectos dependen de la actividad catalítica de MMP28 (**fig. 19**).

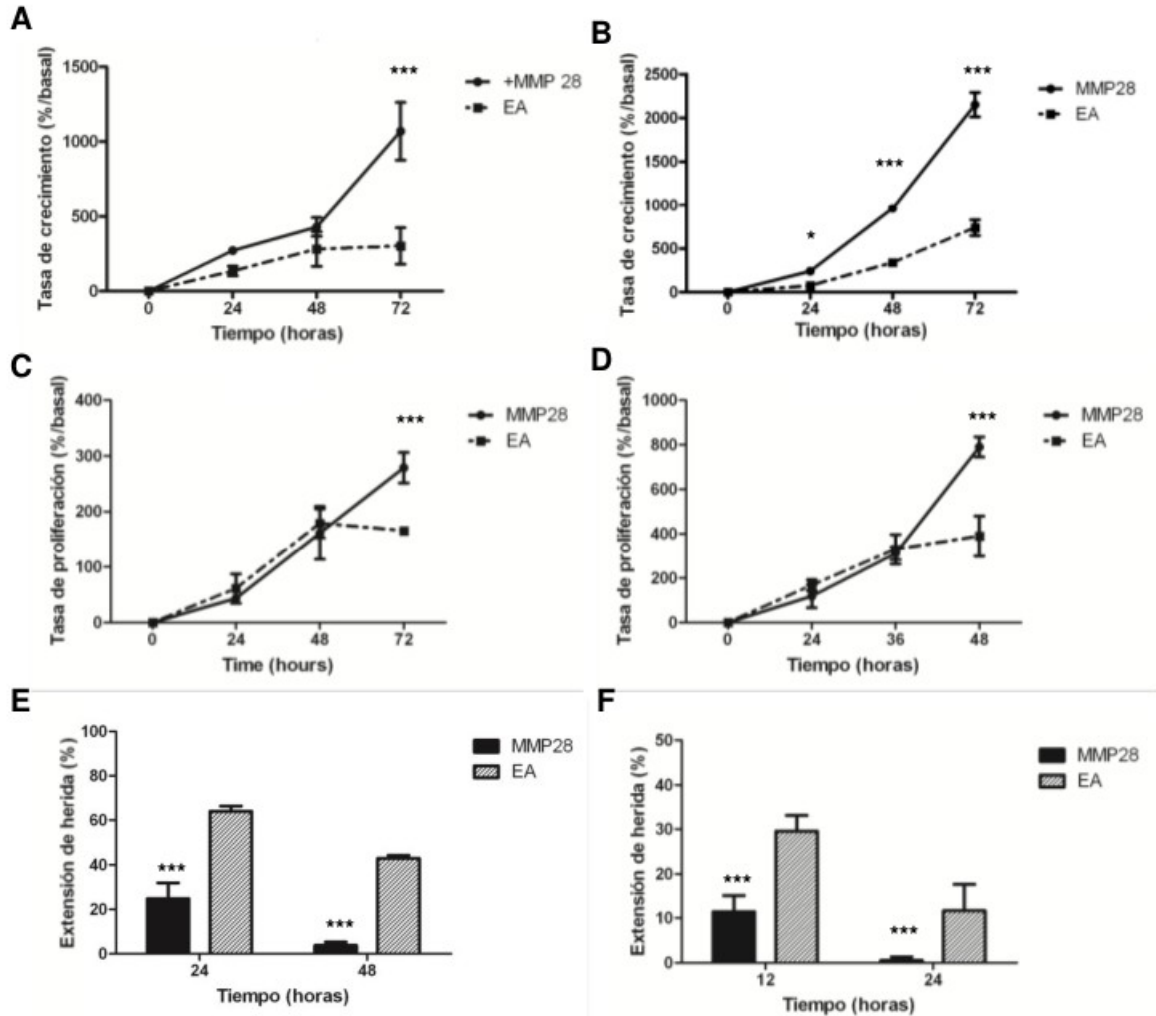


Figura 19. Proliferación y migración son dependientes de actividad catalítica. Tasa de crecimiento en A549 (A) y RLE (B). Tasa de proliferación en A549 (C) y RLE (D). Ensayo de cierre de herida en A549 (E) y RLE (F). Representativos de tres experimentos independientes por triplicado (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

La mutación KQ no afecta la actividad de MMP28

Los ensayos de efectos funcionales se repitieron con la mutante KQ-MMP28 y se encontró que las células se comportan igual que las transfectadas con la WT-MMP28 tanto en proliferación, como en cierre de herida (**fig. 20**). Previamente, se explicó que dichos efectos son dependientes de la actividad catalítica (fig. 19); por lo tanto, mutar dichas lisinas tampoco afecta la actividad catalítica de la enzima.

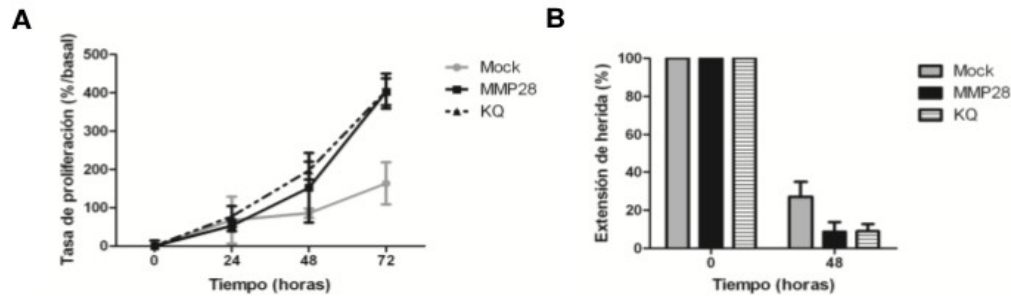


Figura 20. La mutación de lisinas no afecta actividad catalítica. A. Tasa de proliferación. B. Ensayo de cierre de herida. Representativos de tres experimentos independientes por cuadruplicado. No hay diferencia entre WT-MMP28 y KQ-MMP28.

Análisis de Mmp28 en modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

Mediante IHC se estudió la localización de Mmp28 en pulmón de ratón WT en el modelo de daño inducido por bleomicina. Se observó la expresión de Mmp28 tanto en macrófagos alveolares como en epitelio bronquial, pero de manera interesante también se encontraron algunos neumocitos tipo II positivos (**fig. 21 A**).

Se montó el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones silvestres (WT) y deficientes en Mmp28 (KO). Los pulmones se homogenizaron y se estudió mediante WB la expresión de Mmp28, se observó que a nivel de proteína sí se observa un aumento a los 7 y 14 días (**fig 21 B**); sin embargo, igual que en las muestras de humano, a nivel de mensajero no hay cambios significativos.

La cuantificación de hidroxiprolina (OH-Proline) como reflejo de la colágena sintetizada a los 14 días demostró que los ratones KO desarrollaron menos fibrosis que los WT (**fig. 21 C**). En el **panel D la figura 21** se presentan algunas imágenes de tejidos teñidos con la técnica tricrómica de Masón para destacar colágenas fibrilares (azul).

Además, se aislaron células epiteliales de pulmón de ratón WT y KO y con ellas se montaron ensayos de migración en cámaras Boyden recubiertas con colágena I. Como quimioatrayente se utilizó EGF de ratón. Los resultados de 4 experimentos independientes corroboraron los hallazgos obtenidos a partir de células transfectadas y silenciadas: las células de ratones KO migran menos que las de ratones WT (**fig. 21 E**).

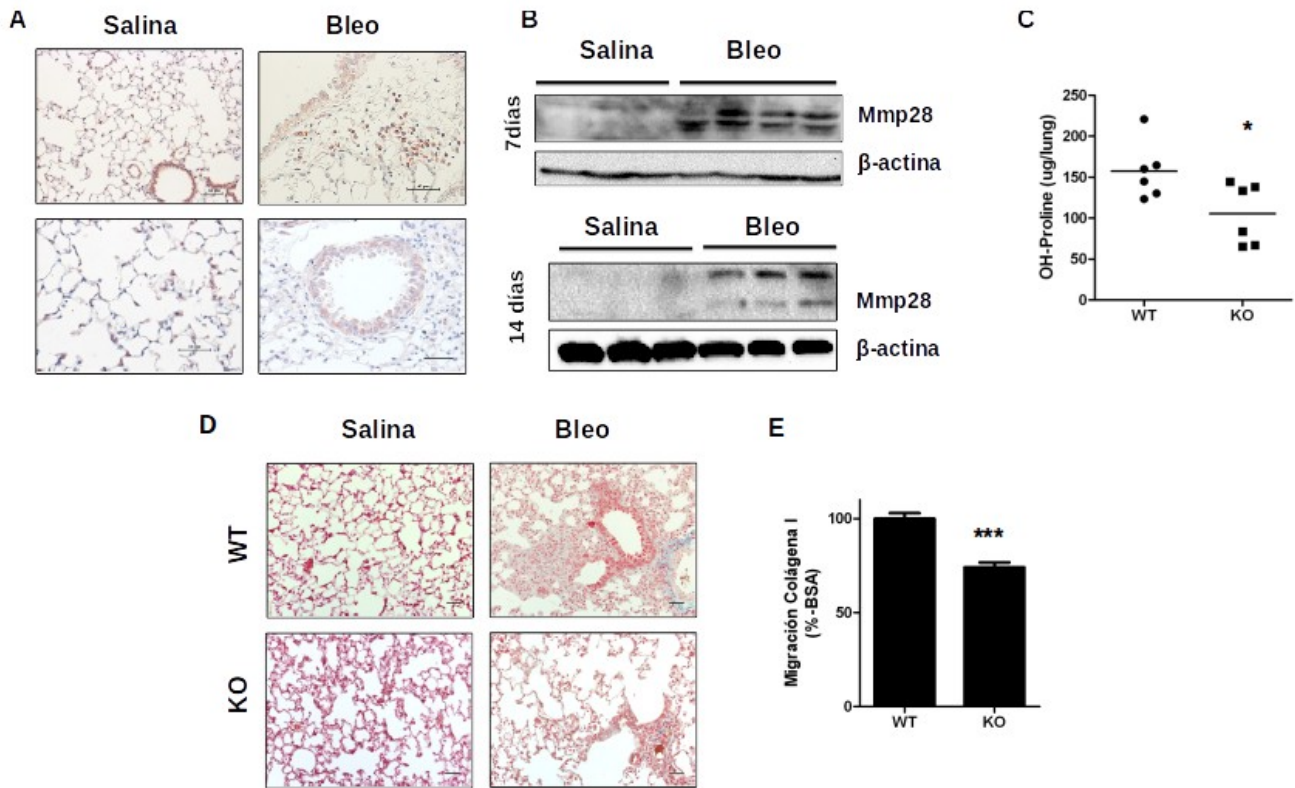


Figura 21. Mmp28 en ratón. A. IHC de pulmón de ratón WT con solución salina o con bleomicina (bleo). B. WB de pulmón de ratón WT. C. Cuantificación de hidroxiprolina a los 14 días. D. Imágenes representativas del modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina a los 14 días. E. Transmigración en cámara Boyden recubierta con colágena I con células epiteliales de pulmón de ratón.

MMP28, prometedor biomarcador diagnóstico

Además de determinar la expresión de MMP28 en muestras pulmonares de pacientes con FPI, se midió su concentración en suero y no solamente se comparó con sujetos sanos, sino con pacientes con fibrosis pulmonar derivada de enfermedades distintas a FPI (grupo no-FPI). Todas las muestras se obtuvieron bajo protocolos aprobados por los Comités de Ética y todos los participantes dieron consentimiento escrito informado. Se midieron muestras de 47 adultos mayores, 124 pacientes con FPI y 110 pacientes del grupo no-FPI. Las muestras de la cohorte mexicana (cohorte de derivación) se obtuvieron del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER, Ciudad de México, México). Las muestras de la cohorte de validación se obtuvieron del Hospital Universitari Bellvitge por colaboración con María Molina Molina (Barcelona, España).

El diagnóstico de FPI se estableció de acuerdo con criterios internacionales basados en la presencia del patrón de neumonía intersticial usual (NIU) en tomografía y/o análisis morfológico de biopsia. En la cohorte mexicana el grupo de pacientes fibróticos no-FPI consistió en 48 pacientes con NH crónica, 5 pacientes con SS y 18 pacientes con EPID consecuencia de AR. En la cohorte española el grupo de no-FPI incluyó dos pacientes con SS, ocho con AR, cuatro con NINE, once con esclerodermia y el resto con NH crónica.

Mediante ELISA se encontró que MMP28 está significativamente elevada en pacientes con FPI (6.78 ± 4.3 ng/ml) versus adultos mayores sanos (1.7 ± 1.9 ng/ml) y pacientes del grupo no-FPI (4.06 ± 3.8 ng/ml), ($p < 0.001$, **fig. 22A**). Estos resultados obtenidos de la cohorte de derivación, se corroboraron en la cohorte de validación: FPI 7.2 ± 4.2 ng/ml, grupo no-FPI 4.3 ± 3.4 ng/ml y controles 2.5 ± 1.3 ng/ml ($p < 0.001$, **fig. 22B**). La cuantificación de MMP28 en BAL mediante ELISA no dio valores positivos.

En el INER se está llevando a cabo un estudio de envejecimiento con adultos mayores asintomáticos a los que se les realizan diversas pruebas entre las que se encuentra la tomografía. Dentro de dicha población se definió un grupo de sujetos asintomáticos con anomalías pulmonares intersticiales (API). Se midió MMP28 a los sujetos API y se encontró que no existe diferencia con respecto a la concentración de MMP28 en suero de controles sin anomalías (**fig. 22C**).

Se realizó el análisis estadístico *receiver operating characteristics* de los resultados obtenidos suponiendo que MMP28 se pueda utilizar como biomarcador diagnóstico. El área bajo la curva de la cohorte mexicana (**fig. 22D**) fue de 0.7188. Tomando como punto de corte 4.5 ng/mL de MMP28 en suero, la sensibilidad y especificidad fueron respectivamente 70.9% y 68.5%, mientras que la razón de momios fue de 5.32, esto es, el riesgo de tener FPI cuando la concentración de MMP28 en suero sea mayor a 4.5 ng/mL. El valor predictivo positivo fue del 73.5% y el valor predictivo negativo fue del 65.7%. El área bajo la curva de la cohorte española (**fig. 22E**) fue de 0.695. Con el mismo punto de corte, la sensibilidad y especificidad fueron respectivamente 67.4% y 66.7%, con razón de momios de 4.57. El valor predictivo positivo fue del 66% y el valor predictivo negativo del 69%.

Se analizó si existe alguna relación entre las pruebas funcionales de los pacientes y su concentración de MMP28 en suero. Mayores concentraciones de MMP28 correlacionaron con menores porcentajes de DLCO en ambas cohortes: $r = -0.1617$, (**fig. 22F**). No se encontró correlación con el porcentaje de FVC (**fig. 22G**).

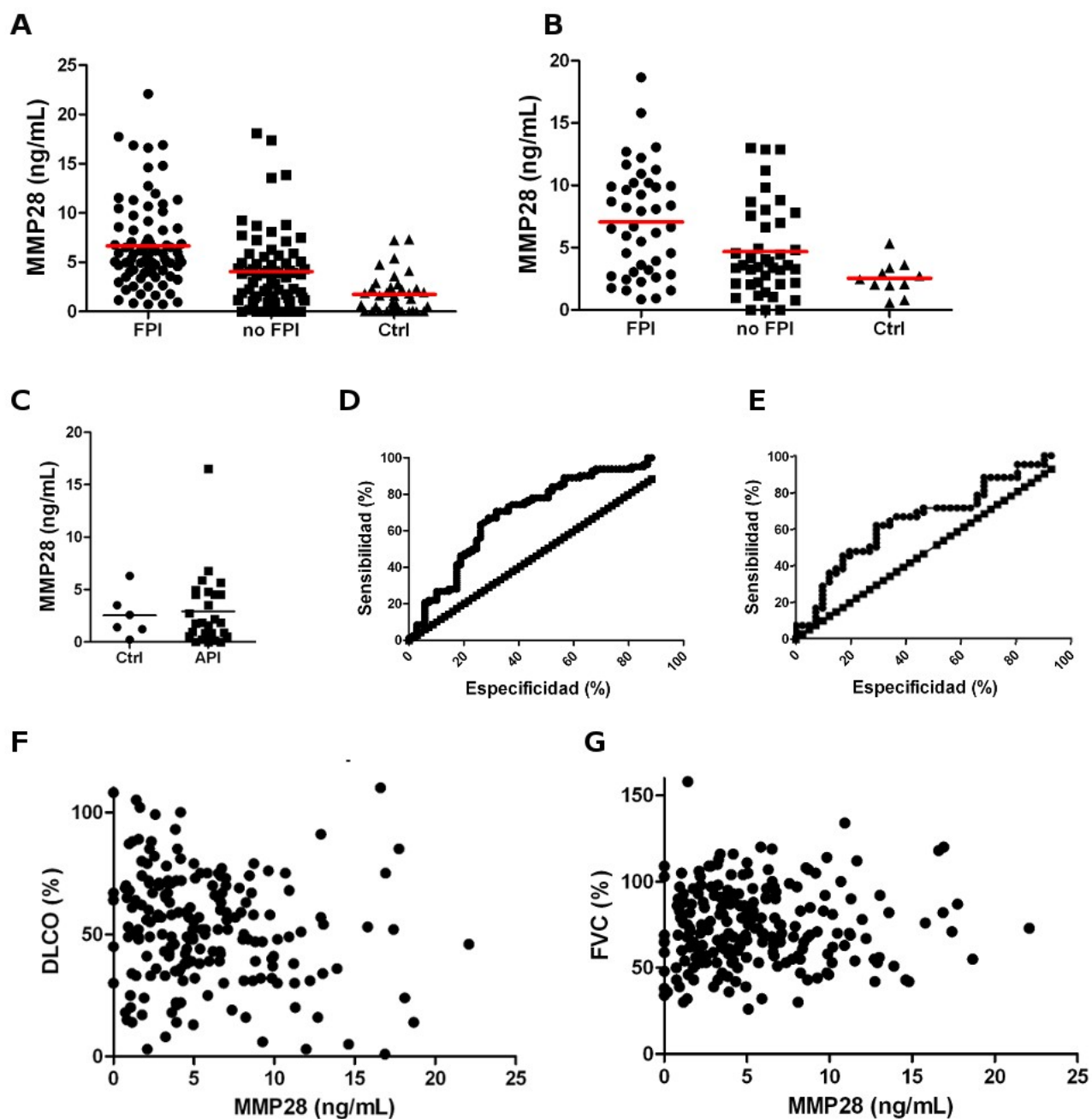


Figura 22. MMP28 está aumentada en suero de pacientes con FPI. A. Concentración de MMP28 en suero de cohorte mexicana (FPI n=82, no-FPI n=69, Control n=36). B. Concentración de MMP28 en suero de cohorte española (FPI n=42, no-FPI n=41, Control n=11). C. Concentración de MMP28 en suero de controles y API (donantes mexicanos). Cada muestra se leyó por duplicado. ANOVA $p < 0.0001$. D. Análisis ROC de cohorte mexicana. E. Análisis ROC de cohorte española. F. Correlación Spearman negativa entre concentración de MMP28 en suero y porcentaje de DLCO en pacientes de ambas cohortes ($\rho = -0.1617$, $p = 0.02$). G. Correlación Spearman entre concentración de MMP28 en suero y porcentaje de FVC en pacientes de ambas cohortes (ns).

DISCUSIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica y generalmente letal, cuya patogénesis no está descrita completamente, pero se sabe que las células epiteliales desempeñan roles fundamentales, incluyendo la expresión de varios miembros de la familia de las MMP, los cuales participan como agentes que se pueden clasificar como anti o pro fibrosantes de acuerdo con resultados obtenidos del modelo animal y de estudios *in vitro* (Pardo et al, 2016).

Este trabajo se centró en el estudio de MMP28 en células epiteliales con la intención de sugerir el papel que desempeña en FPI. No obstante, se analizaron también otros aspectos que previamente no se habían indagado. Para empezar, se midió la expresión a nivel de proteína tanto en pulmón como en suero de pacientes. Se encontró que MMP28 está aumentada a nivel de proteína tanto en el tejido pulmonar como en sangre periférica (suero). Al igual que en el estudio precedente (Maldonado M, 2011), a nivel de RNA no se encontraron diferencias. Explorando si pudiera deberse a algún microRNA, se encontró que probablemente miR20a pudiera unirse al mRNA de MMP28, pero no se observaron diferencias como las que hay entre pulmón control y FPI. Se intentó corroborar el dato de microarreglos que lo señala como disminuido en FPI (Oak et al, 2011); sin embargo, solamente una de las muestras de RNA control amplificó, las demás controles y FPI no amplificaron para miR20a. En los experimentos *in vitro* aparece una disminución parcial no significativa tanto a nivel de mensajero como de proteína. Por lo anterior, para definir si miR20a participa en la regulación de MMP28 hace falta investigar a profundidad con más repeticiones y tiempos, por ahora no se puede responder si es uno de los mecanismos que regulan la expresión de epilisina en condiciones normales versus FPI.

Otra posibilidad de regulación es la degradación de la proteína recién sintetizada; por ejemplo, que en el pulmón sano el proteosoma esté degradando continuamente MMP28. Sin embargo, se ha reportado que en FPI los niveles de proteosoma están aumentados, no disminuídos (Semren et al, 2015). Otra posibilidad es la vía autofágica, la cual sí se ha descrito como disminuída en FPI (Romero et al, 2016), tal desregulación podría ser causal de la acumulación de MMP28 en la patología. Esta hipótesis tendría que probarse en el futuro.

En este trabajo se demostró que la MMP28 es expresada por células epiteliales alveolares y de vías aéreas. La localización nuclear observada por IHC e IF se confirmó con imágenes

obtenidas en el eje Z tanto de tejido como de células. Es importante recalcar que las biopsias de pacientes se obtuvieron en distintos estadios de la enfermedad: en México se obtuvieron al momento de definir el diagnóstico, mientras que en Alemania se obtuvieron durante el trasplante. Este hecho sugiere que la expresión epitelial de la enzima se mantiene durante la progresión de la FPI.

El análisis de citometría confocal indicó que mutar las lisinas de la probable SLN no afectó significativamente la localización de MMP28, este resultado sugiere que dicha secuencia no es el mecanismo que la lleva al núcleo. Las SLN clásicas se encuentran en los extremos amino o carboxilo de las proteínas, entre dominios, o bien, en regiones flexibles tipo bucle. Las SLN son cortas, pobremente definidas y tienden a coincidir por azar con secuencias que no son nucleares; no obstante, los patrones conocidos no abarcan a todas las proteínas nucleares, esto es, no se conocen todas (Marfori et al, 2010).

En este caso, a pesar de que se encuentra en una región accesible, la secuencia encontrada parece no ser una SLN. Otra posibilidad de mecanismo de traslocación nuclear propuesto para MMPs es la internalización mediada por caveolas reportada para MMP14 (Ip et al, 2007). Asimismo, se ha visto que MMP3, MMP12 y el fragmento soluble de MMP14 pueden ser endocitados y llevados al núcleo por varios tipos celulares (Eguchi et al 2008; Marchant et al, 2014). Esta aproximación se consideró para MMP28, tomando la proteína recombinante, tiñéndola por ejemplo con Cy3 y añadiéndola al medio para analizar si las células en cultivo son capaces de internalizarla e incluso llevarla al núcleo; sin embargo, este experimento no se pudo llevar a cabo.

La presencia citosólica y mitocondrial de MMP2 se ha descrito debido a presencia de un péptido señal débil (Ali et al, 2012), o bien, a transcripción de una isoforma más pequeña, sin el péptido señal, inducida por estrés oxidativo del modelo *in vitro* de isquemia-reperfusión (Lovett et al, 2012; Joshi et al, 2016); por lo que un porcentaje de la proteína no está en retículo-golgi-ambiente extracelular, sino que se traduce libre en el citosol.

Se quiso encontrar las condiciones que favorecen la localización nuclear de la epilisina y se probaron diversas variables sin éxito. La conclusión de esta parte de la investigación es que independientemente de la concentración de oxígeno, disponibilidad de nutrientes, sustrato sobre el cuál crecer o ciertos estímulos añadidos, siempre hay una porcentaje de células en las que MMP28 se ubica en el núcleo y otro en el que se ubica en citoplasma, además de otras en las que se encuentra tanto en núcleo como en citoplasma. Es posible que la misma

célula cambie entre estos dos estados; sin embargo, este aspecto no fue evaluado en este trabajo. Los resultados de WB e IF sugieren que la MMP28 nuclear no cuenta con el predominio, sino que ya se encuentra en estado activo.

MMP28 se encontró en núcleo, otras MMPs localizadas en núcleo son MMP1, -2, -3, -9, -10, -11, -13, -14 y -15 (Maldonado 2011; Mannello y Medda, 2012). MMP2 puede degradar poli-ADP ribosa polimerasa (PARP-1, Kwan et al, 2004) y al factor de reparación XRCC1 (*X-ray cross-complementary factor 1*, Yang et al, 2010). Algunas MMPs se han localizado en núcleo luego de isquemia. Por ejemplo, se vio MMP13 en oligodendrocitos y neuronas cerebrales (Cuadrado et al 2009); MMP2 en cardiomiocitos (Kwan et al, 2004) y en neuronas junto con MMP9 y MT1-MMP (Yang et al 2010).

Además de actuar como proteasas, las MMPs pueden regular la transcripción: MMP3 puede funcionar como factor transcripcional para CTGF, uniéndose a la secuencia enhancer TRENDIC (Eguchi et al, 2008), MMP12 se une al promotor de NFKBIA (Marchant et al, 2014) y MT1-MMP participa en la regulación transcripcional de PI3K (Shimizu-Hirota et al, 2012).

Sería interesante inmunoprecipitar MMP28 e identificar las proteínas con las que interactúa e incluso encontrar secuencias blanco de DNA. Así como llevar a cabo experimentos de proteómica cuantitativa para encontrar sustratos y las vías de señalización involucradas en los efectos de MMP28, tanto en los dependientes como en los independientes de actividad catalítica (con la mutante EA).

Con los experimentos de sobreexpresión y silenciamiento se demostró en este trabajo que la MMP28 está relacionada con un fenotipo proliferativo y migratorio en células epiteliales alveolares y bronquiales y que depende de la actividad catalítica; además, se confirmó que esta enzima brinda resistencia a la apoptosis como se reportó previamente (Manicone et al 2011). El hecho de que el aumento en proliferación y cierre de herida se hayan observado tanto en células alveolares como en bronquiales, sugiere que estos efectos estén relacionados con la MMP28 no nuclear. Aunque por otra parte, epilisina colocalizó con histona H3 fosforilada, marcador de proliferación, en núcleos de células epiteliales de pacientes con FPI. Es posible que los efectos de MMP28 sean múltiples y favorezca la proliferación estando en el medio extracelular o en citoplasma, así como desde el núcleo, ya sea como proteasa o como cofactor transcripcional.

Estudios previos en líneas celulares de cáncer reportaron por una parte que favorece la migración (Illman et al, 2006), por otra que la disminuye promoviendo un fenotipo más

adhesivo y menos migratorio (Rodgers et al, 2009), o que no hay efecto (Manicone et al, 2011). Asimismo, en cáncer gástrico y varias líneas celulares de cáncer gástrico, la epilisina está aumentada y correlaciona con un fenotipo más invasivo (Jian et al, 2011).

Con respecto a la participación de MMP28 en la TEM, los resultados de este trabajo indican que la epilisina favorece este proceso: con el estímulo de TGF- β 1, las células que la sobreexpresan pierden el marcador epitelial y sintetizan el marcador mesenquimal antes que las células control. No obstante, el silenciamiento de la enzima no afectó el proceso. Por lo anterior, se sugiere que MMP28 favorece la TEM, aunque no es necesaria para que se lleve a cabo.

El ratón deficiente de Mmp28 desarrolla menos fibrosis que el silvestre, demostrado en esta tesis con cuantificación de hidroxiprolina de pulmones de ratón instilados con dosis completa y sugerido previamente mediante rojo sirio con dosis subóptima (Gharib et al, 2014). La bleomicina instilada intratraquealmente en el ratón provoca la muerte de las células del epitelio alveolar, y neumonitis que evoluciona a fibrosis, misma que eventualmente se resuelve. En cambio, la FPI es una fibrosis iniciada por el epitelio donde la inflamación no figura como mecanismo patogénico.

Tanto en el modelo murino de fibrosis pulmonar como en el de enfisema, la investigación se centró sobre la Mmp28 expresada por los macrófagos. En esta tesis se mostraron imágenes de IHC donde se ve que los neumocitos tipo II también expresan epilisina, y aunque Mmp28 proteja a las células contra la apoptosis, el ratón deficiente desarrolló menos fibrosis. Probablemente el efecto en el ratón esté más relacionado con la epilisina producida por los macrófagos. Cabe recordar que tanto en humano como en ratón, no se encontraron diferencias a nivel de RNA, pero sí de proteína.

MMP28 como biomarcador

En la búsqueda por una firma proteica en sangre periférica característica de FPI, uno de los primeros trabajos que sobresalieron fue la propuesta de que altas concentraciones de MMP7 y MMP1, juntas, son suficientes para distinguir pacientes de FPI contra EPOC, NH, sarcoidosis y sujetos sanos (Rosas et al, 2008). En los siguientes años otros grupos confirmaron el nivel elevado de MMP7 en pacientes con FPI (Richards et al, 2012; Ulivi et al, 2013; Morais et al, 2015). En particular, Morais y colaboradores encontraron más MMP7 en

suero de pacientes con FPI versus pacientes con neumonía intersticial no específica (NINE) y otros pacientes con patrón NIU que no tienen FPI (Morais et al, 2015).

Se ha reportado que los niveles de MMP3, MMP7, MMP8 y MMP9 en BAL de pacientes con FPI es más alto que en controles (McKeown et al, 2009). No obstante, los niveles altos de MMP8 y MMP9 no son únicos de pacientes con FPI, también están elevados en pacientes con NH crónica (Willems et al 2013). Hace algunos años se publicó una revisión de las moléculas que se han propuesto como biomarcadores para FPI, ya sea de predisposición, diagnóstico, pronóstico o terapéuticos, y se encontró que solamente dos de ellas cuentan con evidencia fuerte que las sustente como biomarcadores, ambos de pronóstico: MMP7 y MUC5B (Ley et al 2014).

La concentración de MMP28 en suero de pacientes con FPI es significativamente más alta con respecto a la que presentan sujetos mayores sanos y pacientes con EPID distintas a FPI, tales como NH crónica e incluso AR, donde se mostró aumentada versus controles (Kevorkian et al, 2004). Este resultado es de gran importancia puesto que la incertidumbre al momento de diagnosticar es un problema clínico de consecuencias graves debido a que la estrategia terapéutica no es la misma. Para impedir que la FPI avance tan rápido, existen dos medicamentos aprobados como tratamiento: pirfenidona y nintedanib (Raghu et al, 2015). Por otra parte, los pacientes con enfermedades inflamatorias o autoinmunes deben tomar corticoesteroides e inmunosupresores, los cuales han mostrado ser perjudiciales para pacientes con FPI (Raghu et al, 2012).

Los biomarcadores diagnóstico propuestos para FPI son muy pocos. Los más prometedores para discriminar entre pacientes con y sin FPI incluyen a MMP7 en combinación con otras moléculas (Rosas et al, 2008; Moraes et al, 2015; White et al, 2016). Uno de los más recientes consiste en la combinación de osteopontina, MMP7 y SP-D medido en plasma (White et al, 2016); cabe resaltar que en dicha investigación no se comparó con pacientes de NH, y además la triada no distinguió pacientes de FPI versus pacientes con AR, que son las patologías con las que más se confunde a la FPI dado que ambos pueden mostrar patrón tipo NIU.

Los resultados de la cohorte de derivación sugirieron que MMP28 podría fungir como biomarcador diagnóstico para FPI comparando con NH y AR, principalmente. Estos datos fueron corroborados con la cohorte de validación. Asimismo, la correlación negativa con los porcentajes de DLCO sugiere que la concentración de MMP28 también podría tener valor

predictivo en cuanto a pronóstico. Para evaluar si tiene que ver con la progresión de la enfermedad, tendrá que medirse en un estudio longitudinal. En resumen, estos resultados indican que MMP28 puede mejorar la precisión de diagnóstico de FPI.

CONCLUSIONES

MMP28 está presente en los pulmones de pacientes con FPI donde se sintetiza principalmente en las células epiteliales. Se localiza en núcleo y citoplasma de células epiteliales alveolares, así como en la zona apical y el citoplasma de las células bronquiales. *In vitro* promueve proliferación, migración y TEM, características de algunas de las células epiteliales aberrantemente activadas en FPI. El ratón deficiente desarrolla menos fibrosis con la instilación de bleomicina. Por lo tanto, podría considerarse que MMP28 es parte de los elementos profibróticos de la FPI, que además mantiene su expresión durante la progresión de la enfermedad. Por otra parte, la concentración sérica de MMP28 podría incluirse como prueba diagnóstica de FPI versus EPID como NH crónica, SS y AR.

REFERENCIAS

Tortora GJ y Grabowski SR. Principios de anatomía y fisiología. *Oxford University Press*. Novena Edición. 2002; pp. 783-825.

Silverthorn DU. Human Physiology: An Integrated Approach, 5th Ed. *Pearson Education Inc*. 2009. EEUU, pp. 518-570.

Uribe Aranzábal MC y Aguilar Morales ME. Aparato respiratorio. En: Atlas de histología de vertebrados. Estrada Flores E y Uribe Aranzábal MC, compiladoras. UNAM. 2002. pp 91-95.

Xaubet A, Molina-Molina M, Sánchez M. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas. *Arch Bronconeumol*. 2007;43(Supl 2):24-30.

Molina-Molina M. Clasificación de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas: interpretación clínico-terapéutica y actualización. *Medicina respiratoria*. 2008;(1)1:39-47.

Selman M, Pardo A. The pathogenesis of pulmonary fibrosis. In: Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. *McGraw Hill*, 2008; Fourth Edition, vol. 1, chapter 26, pp. 371-383.

Mora AL, Rojas M, Pardo A, Selman M. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(11):755-772.

Koo SM, Uh ST. Treatment of connective tissue disease-associated interstitial lung disease: the pulmonologist's point of view. *Korean J Intern Med*. 2017;32(4):600-610.

Selman M y Buendía-Roldán I. Immunopathology, diagnosis, and management of hypersensitivity pneumonitis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33(5):543-54.

Selman M, Pardo A, King TE Jr. Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(4):314-24.

Selman M, King Jr TE, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann Intern Med*, 2001;134:136-151.

Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. An integral model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:1161-72.

Selman M, López-Otín C, Pardo A. Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2016;48(2):538-52.

King Jr TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The lancet*. 2011;378(9807):1949-61.

Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, Swigris JJ, Taniguchi H, Wells AU. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17074.

Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Martinez FJ, de Andrade JA, Anstrom KJ, King TE Jr, Raghu G. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370(22):2093-101.

Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2005;166:1321–1332.

Andersson-Sjöland A, Garcia-de Alba C, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G, Selman M. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:2129–2140.

Xu Y, Mizuno T, Sridharan A, Du Y, Guo M, Tang J, Wikenheiser-Brokamp KA, Perl AT, Funari VA, Gokey JJ, Stripp BR, Whitsett JA. Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight* 1, e90558 (2016).

Pardo A, Cabrera S, Maldonado M, Selman M. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2016;17:23. doi: 10.1186/s12931-016-0343-6.

Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg J-O. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS Journal*, 2011; 278: 28-45.

Pardo A, Selman M, Kaminski N. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40: 1141–1155.

Sommerville RPT, Oblander SA y Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology*, 2003;4(6):216.

Cauwe B y Opdenakker G. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010; 45(5): 351–423.

Manello F y Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 2012;47: 27-58.

Jenkins RG, Moore BB, Chambers RC, Eickelberg O, Königshoff M, Kolb M, Laurent GJ, Nanthakumar CB, Olman MA, Pardo A, Selman M, Sheppard D, Sime PJ, Tager AM, Tatler AL, Thannickal VJ, White ES; ATS Assembly on Respiratory Cell and Molecular Biology. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56(5):667-679.

Morrison CJ, Butler GS, Rodríguez D, Overall CM. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21:645–53.

Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, et al. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*. 2005;2,e251.

Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3[stromelysin-1] and matrix metalloproteinase-7 [matrilysin]. *J Biol Chem*. 2001;276:28261–7.

Yamashita CM, Dolgonos L, Zemans RL, Young SK, Robertson J, Briones N, et al. Matrix metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2011;179:1733–45.

Yu G, Kovkarova-Naumovski E, Jara P, Parwani A, Kass D, Ruiz V, et al. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:752–62.

Hodges RJ, Jenkins RG, Wheeler-Jones CP, Copeman DM, Bottoms SE, Bellingan GJ, et al. Severity of lung injury in cyclooxygenase-2-deficient mice is dependent on reduced prostaglandin E(2) production. *Am J Pathol*. 2004;165:1663–76.

Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbla P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, et al. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol.* 2005;167:365–79.

Ramírez G, Hagood JS, Sanders Y, Ramírez R, Becerril C, Segura L, et al. Absence of Thy-1 results in TGF- β induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Lab Invest.* 2011;91:1206–18.

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

Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, Ramírez R, Jara P, D'Armiento J, et al. Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:2324–38.

Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks WC, Shipley JM, Senior RM. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am J Pathol.* 2000;157:525–35.

Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. Epilysin, a Novel Human Matrix Metalloproteinase (MMP-28) expressed in Testis and Keratinocytes and in Response to Injury. *J Biol Chem*, 2001; 276(13): 10134–10144.

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

Illman SA, Lehti K, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J Cell Sci*, 2006; 119: 3856–3865.

Pavlaki M, Zucker S, Dufour A, Calabrese N, Bahou W, Cao J. Furin Functions as a Nonproteolytic Chaperone for MatrixMetalloproteinase-28: MMP-28 Propeptide Sequence Requirement. *Biochemistry Research International.* 2011. Article ID 630319, 12 pages.

Lin MH, Liu SY, Su HJ, Liu YCh. Functional role of matrix metalloproteinase-28 in the oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 2006; 42:907– 913.

Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jahkola T, Suomela S, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) Expression is Associated with Cell Proliferation During Epithelial Repair. *J Invest Dermatol*, 2002; 119: 14-21.

Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SM, Edwards DR, Parker AE, Clark IM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum*, 2004; 50(1): 131-41.

Momohara S, Okamoto H, Komiya K, Ikari K. Matrix metalloproteinase 28/epilysin expression in cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: comment on the article by Kevorkian et al. *Arthritis Rheum*, 2004;50(12): 4074–5; author reply 4075.

Jian P, Yanfang T, Zhuan Z, Jian W, Xueming Z, Jian N. MMP28 (epilysin) as a novel promoter of invasion and metastasis in gastric cancer. *BMC Cancer*, 2011;11: 200.

Heiskanen TJ, Illman SA, Lohi J, Keski-Oja J. Epilysin (MMP-28) is deposited to the basolateral extracellular matrix of epithelial cells. *Matrix Biol*. 2009; 28: 74–83.

Werner SR, Mescher AL, Neff AW, King MW, Chaturvedi S, Duffin KL, Harty MW, Smith RC. Neural MMP-28 Expression Precedes Myelination During Development and Peripheral Nerve Repair. *Developmental Dynamics*, 2007;236:2852–2864.

Illman SA, Lohi J, Keski-Oja J. Epilysin (MMP-28) – structure, expression and potential functions. *Exp. Dermatol*, 2008; 17: 897–907.

Manicone AM, Harju-Baker S, Johnston LK, Chen AJ, Parks WC. Epilysin (matrix metalloproteinase-28) contributes to airway epithelial cell survival. *Respir Res*. 2011;12:144.

Gharib SA, Johnston LK, Huizar I, Birkland TP, Hanson J, Wang Y, Parks WC, Manicone AM. MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol*. 2014;95:9-18.

Manicone AM, Gharib SA, Gong KQ, Eddy WE, Long ME, Frevert CW, Altemeier WA, Parks WC, Houghton AM. Matrix Metalloproteinase-28 Is a Key Contributor to Emphysema Pathogenesis. *Am J Pathol*. 2017;187(6):1288-1300.

Maldonado Bonilla M S. Expresión de la metaloproteínasa de matriz 28 en fibrosis pulmonar idiopática. 2011. Tesis, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provar N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, 2009; 29; 10(1): 202, <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>.

Rost B, Yachdav G, Liu J. The Predict Protein Server. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32 (Web Server issue): W321-W326 <http://www.predictprotein.org>

Manicone AM, Birkland TP, Lin M, Betsuyaku T, van Rooijen N, Lohi J, Keski-Oja J, Wang Y, Skerrett SJ, Parks WC. Epilysin (mmp-28) restrains early macrophage recruitment in pseudomonas aeruginosa pneumonia. *J Immunol*. 2009;182:3866-3876.

Cabrera S, Maciel M, Herrera I, Nava T, Vergara F, Gaxiola M, López-Otín C, Selman M, Pardo A. Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autophagy*. 2015;11(4):670-84.

Herrera I, Cisneros J, Maldonado M, Ramírez R, Ortiz-Quintero B, Anso E, Chandel NS, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinase (MMP)-1 induces lung alveolar epithelial cell migration and proliferation, protects from apoptosis, and represses mitochondrial oxygen consumption. *J Biol Chem*. 2013;288(36):25964-75.

Staab-Weijnitz CA, Fernandez IE, Knüppel L, Maul J, Heinzelmann K, Juan-Guardela BM, Hennen E, Preissler G, Winter H, Neurohr C, Hatz R, Lindner M, Behr J, Kaminski N, Eickelberg O. FK506-Binding Protein 10, a Potential Novel Drug Target for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(4):455-67.

George TC, Fanning SL, Fitzgerald-Bocarsly P, Medeiros RB, Highfill S, Shimizu Y, Hall BE, Frost K, Basiji D, Ortyń WE, Morrissey PJ, Lynch DH. Quantitative measurement of nuclear translocation events using similarity analysis of multispectral cellular images obtained in flow. *J Immunol Methods*. 2006;311(1-2):117-29.

Agarwal V, Bell GW, Nam J, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 2015;4:e05005 DOI: 10.7554/eLife.05005. Sitio web consultado: http://www.targetscan.org/vert_71/

Oak SR, Murray L, Herath A, Sleeman M, Anderson I, Joshi AD, Coelho AL, Flaherty KR, Toews GB, Knight D, Martinez FJ, Hogaboam CM. A micro RNA processing defect in rapidly progressing idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS ONE* 2011;6(6):e21253.

Smirnova NF, Schamberger AC, Nayakanti S, Hatz R, Behr J, Eickelberg O. Detection and quantification of epithelial progenitor cell populations in human healthy and IPF lungs. *Respir Res.* 2016;17:83.

Cuadrado E, Rosell A, Borrell-Pages M, Garcia-Bonilla L, Hernandez-Guillamon M, Ortega-Aznar A, Montaner J. Matrix metalloproteinase-13 is activated and is found in the nucleus of neural cells after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009; 29:398–410.

Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims DE, Sawicki G, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *The FASEB Journal*, 2004;1: 690-692.

Yang Y, Candelario-Jalil E, Thompson JF, Cuadrado E, Estrada EY, Rosell A, Montaner J, Rosenberg GA. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, 2010; 112: 134–149.

Semren N, Welk V, Korfei M, Keller IE, Fernandez IE, Adler H, Günther A, Eickelberg O, Meiners S. Regulation of 26S Proteasome Activity in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(9):1089-101.

Romero Y, Bueno M, Ramirez R, Álvarez D, Sembrat JC, Goncharova EA, Rojas M, Selman M, Mora AL, Pardo A. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell.* 2016;15(6):1103-1112.

Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Medhi AM, Saunders NFW, Curmi PM, Forwood JK, Bodén M, Kobe B. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010; 1813: 1562-1577.

Ip YC, Cheung ST y Fan ST. Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*, 2007; 46: 225–230.

Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol*. 2008; 28:2391–2413.

Marchant DJ, Bellac CL, Moraes TJ, Wadsworth SJ, Dufour A, Butler GS, Bilawchuk LM, Hendry RG, Robertson AG, Cheung CT, Ng J, Ang L, Luo Z, Heilbron K, Norris MJ, Duan W, Bucyk T, Karpov A, Devel L, Georgiadis D, Hegele RG, Luo H, Granville DJ, Dive V, McManus BM, Overall CM. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nature Med*. 2014;20:493-502.

Ali MA, Chow AK, Kandasamy AD, Fan X, West LJ, Crawford BD, Simmen T, Schulz R. Mechanisms of cytosolic targeting of matrix metalloproteinase-2. *J Cell Physiol*. 2012;227(10):3397-404.

Lovett DH, Mahimkar R, Raffai RL, Cape L, Maklashina E, Cecchini G, Karliner JS. A Novel Intracellular Isoform of Matrix Metalloproteinase-2 Induced by Oxidative Stress Activates Innate Immunity. *PLoS One*. 2012;7(4):e34177.

Joshi SK, Lee L, Lovett DH, Kang H, Kim HT, Delgado C, Liu X. Novel intracellular N-terminal truncated matrix metalloproteinase-2 isoform in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Orthop Res*. 2016;34(3):502-9.

Shimizu-Hirota R, Xiong W, Baxter BT, Kunkel SL, Maillard I, Chen XW, Sabeh F, Liu R, Li XY, Weiss SJ. MT1-MMP regulates the PI3K δ •Mi-2/NuRD-dependent control of macrophage immune function. *Genes Dev*. 2012;26:395-413.

Rodgers UR, Kevorkian L, SurrIDGE AK, Waters JG, Swingler TE, Culley K, Illman S, Lohi J, Parker A E, Clark IM. Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-28. *Matrix Biol*, 2009; 28(5-

3):263–272.

Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, et al. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*. 2008; 5(4): e93.

Richards TJ, Kaminski N, Baribaud F, Flavin S, Brodmerkel C, Horowitz D, Li K, Choi J, Vuga LJ, Lindell KO, Klesen M, Zhang Y, Gibson KF. Peripheral blood proteins predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(1):67-76.

Ulivi P, Casoni GL, Foschi G, Scarpi E, Tomassetti S, Romagnoli M, Ravaglia C, Mengozzi M, Zoli W, Poletti V. MMP-7 and fcDNA serum levels in early NSCLC and idiopathic interstitial pneumonia: preliminary study. *Int J Mol Sci*. 2013;14:24097–24112.

Morais A, Beltrao M, Sokhatska O, Costa D, Melo N, Mota P, Marques A, Delgado L. Serum metalloproteinases 1 and 7 in the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial pneumonias. *Respir Med*. 2015; 109(8):1063-8.

White ES, Xia M, Murray S, Dyal R, Flaherty CM, Flaherty KR, et al. Plasma Surfactant Protein-D, Matrix Metalloproteinase-7, and Osteopontin Index Distinguishes Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Other Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016; 194: 1242-1251.

McKeown S, Richter AG, O'Kane C, McAuley DF, Thickett DR. MMP expression and abnormal lung permeability are important determinants of outcome in IPF. *Eur Respir J*. 2009; 33: 77–84.

Willems S, Verleden SE, Vanaudenaerde BM, Wynants M, Doms C, Yserbyt J, Somers J, Verbeken EK, Verleden GM, Wuyts WA. Multiplex protein profiling of bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. *Ann Thorac Med*. 8(1):38-45, 2013.

Ley B, Brown KK, Collard HR. Molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014; 307: L681–L691.

Raghu G, Rochweg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, Brozek JL, Collard HR, Cunningham W, Homma S, Johkoh T, Martinez FJ, Myers J, Protzko SL, Richeldi L, Rind D, Selman M, Theodore A, Wells AU, Hoogsteden H, Schünemann HJ; American Thoracic Society; European Respiratory society; Japanese Respiratory Society; Latin American Thoracic Association. An Official

ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Jul 15;192(2):e3-19.

Raghu G, Anstrom KJ, King TE Jr, Lasky JA, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2012; 366: 1968-1977.

Apéndice. Protocolos.

Bacterias y plásmidos

Bacterias competentes. Se crecieron bacterias toda la noche. Al siguiente día, se diluyeron y se continuaron creciendo hasta tener una D.O. $500\text{nm} \leq 0.6$. Se colocaron en hielo 5 a 10 minutos para detener el crecimiento. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet en 5mL de CaCl_2 0.1M frío. Después de 20 minutos en hielo, se volvió a centrifugar con las mismas condiciones; ahora el pellet se resuspendió en 800 μL de CaCl_2 0.1M. Se dejaron a 4°C dos horas y se continuó con la transformación.

Transformación. Se tomaron 100 μL de bacterias competentes y se colocaron en un tubo estéril y frío. Se agregaron 50ng (5 μL) de plásmido y se dejaron en hielo 30 minutos. Se les dio un choque térmico de 2 minutos a 42°C, de inmediato se pasaron a hielo 5 minutos. Se agregó 1mL de LB y se permitió que las células se recuperaran 90 minutos a 37°C en agitación. Finalmente se plaquearon en LB agar con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina y se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

Extracción de plásmidos. Se creció una colonia de cada tipo de bacterias transformadas (vector control y con mmp-28) hasta tener cultivos de 100mL. Se centrifugaron a 5500 rpm 15 minutos a 4°C. Se realizó lisis alcalina y el sobrenadante con DNA plasmídico se purificó con una columna QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Una vez extraído, se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70%, el pellet se resuspendió en buffer TE pH 8.

1. Centrifugar cultivo 15 min 4°C 6000 x g.
2. Resuspender pellet de bacterias en 10mL de buffer P1 (buffer de resuspensión). Asegurarse de que el buffer ya tiene RNasa A y lyse Blue. Subir y bajar con pipeta hasta que no haya cúmulos.
3. Añadir 10mL de buffer P2, mezclar por inversión vigorosamente 4-6 veces e incubar a temperatura ambiente (TA) 5 min (lisis alcalina). No Vórtex.
4. Agregar 10mL de buffer P3 frío (buffer de neutralización), inmediatamente mezclar por inversión 4-6 veces e incubar en hielo 30 min.
5. Mezclar por inversión nuevamente. Centrifugar 30 min a 4°C 20 000 x g. El SN debe ser claro, contiene el plásmido, tomar bien todo el SN y centrifugar nuevamente, ahora en 15 min a 4°C 20 000 x g.

6. Equilibrar una QIAGEN-tip (columna) con 10mL de buffer QBT (buffer de equilibración) y permitir que la columna se vacíe por gravedad.
7. Agregar el SN del paso 5 a la QIAGEN-tip y permitir que entre en la resina por gravedad.
8. Lavar la columna con 30mL de buffer QC, permitir que pase por gravedad y repetir.
9. Eluir el DNA con 15mL de buffer QF, coleccionar el eluido en un tubo de 50mL.
10. Precipitar el DNA con 10.5mL de isopropanol TA. Mezclar y centrifugar 1 hora a 3500rpm a 4°C. El pellet que se forma en isopropanol tiene apariencia de vidrio por lo que puede ser difícil verlo. Además este pellet se pega menos al tubo por lo que el SN se debe remover muy cuidadosamente.
11. Lavar el DNA con 5mL de etanol al 70% a TA, centrifugar a 3500rpm 1 hora (o 10min a 15 000 x g). Cuidadosamente decantar el SN sin perturbar el pellet. El etanol al 70% remueve sales precipitadas y reemplaza el isopropanol con el etanol que es más volátil, haciendo que el DNA sea más fácil de disolver.
12. Secar el pellet “al aire” durante 10min y resuspender el DNA en un volumen adecuado por ejemplo de buffer TE pH 8.0 (si se seca de más, será difícil resuspender).

Digestión. Para corroborar las características de los plásmidos, se llevó a cabo una reacción de digestión con Xho I. Debido a la baja actividad de la enzima, se realizó durante 48hrs a 37°C con 2 unidades de enzima (2 µL), buffer 10x (2 µL), 180ng de plásmido y agua hasta llevar a 20 µL. Para observar el resultado se corrieron 3 µL de la reacción en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

Infección con partículas lentivirales

Día 1. Sembrar 80,000 células A549 en cada uno de seis pozos de caja de doce pozos.

Día 2. Añadir medio con polibrene (sc-134220, Santa Cruz) a una concentración de 5µg/mL y 20µL de partículas lentivirales control (shCtrl sc-108080, Santa Cruz) o con shMMP28 (sc-62278-V, Santa Cruz).

Día 3. Retirar el virus.

Día 6. Dividir células 1:6

Día 7. Seleccionar con 2µg/mL de puomicina en medio F12 con 10% de suero (A549).

Día 17. Extraer RNA, proteína total y congelar las demás células.

Imaging

Tratamiento de cubreobjetos. Colocar cubreobjetos en caja Petri de vidrio. Cubrir con mezcla de ácidos HCl y H₂SO₄ 1:1. Dejar en agitación 20min. Recuperar el ácido (pues se puede reutilizar). Lavar 30min al chorro de agua, en la misma caja Petri. Bañar 2 o 3 veces con etanol al 70%. Guardar en un frasco estéril con etanol al 70%.

Inmunofluorescencia celular

1. Fijar células con p-formaldehído al 4% 10 min (El p-formaldehído se diluye en PBS 1x tibio, en vaso de vidrio tapado con aluminio porque desprende vapores. Las células se lavan dos veces con PBS 1x, se añade el p-formaldehído filtrado con acrodisco, que las cubra por completo, se retira y se vuelve a lavar dos veces con PBS. Entonces se pueden refrigerar o continuar con IF).
2. Lavar en PBS 1x, 2min TA 3 veces.
3. Permeabilizar con tritón x-100 0.1% 30 segundos.
4. Lavar en PBS 5min 3 veces.
5. Bloquear con SFB al 5% en PBS.
6. Incubar toda la noche 4 °C anticuerpo primario en PBS con SFB al 5%.
7. Lavar 3 veces con PBS.
8. Lavar 2 veces con PBS con SFB al 5%.
9. Incubar con anticuerpo secundario en oscuridad TA 45min.
10. Lavar con PBS.
11. Teñir con DAPI 300nM 2min y lavar.
12. Montar de acuerdo a protocolo del medio que se use.
13. Observar en microscopio confocal Olympus FluoView™ FV1000.

Inmunofluorescencia tisular

1. Desparafinar tejidos incubando 10min en xilol y 30seg en: xilol (2^a vez), etanol 100%, etanol 100%, etanol 96%, etanol 96% y dejar en agua. Opcional: incubar a 65°C 1h antes de incubar en xilol.
2. Recuperar antígenos: incubar en buffer de citratos y hervir en cámara de acuerdo al programa recomendado.

3. Delimitar tejido con plumón hidrofóbico.
4. Incubar con 1h a TA con PBS con 2% de suero de cerdo y 0.5% de tritón x-100.
5. Dar un lavado rápido de PBS.
6. Incubar toda la noche con anticuerpo primario a 4°C en cámara húmeda.
7. Lavar 5 veces con PBS+tween 20 al 0.05%, aspirando con vacío.
8. Incubar con anticuerpo secundario 1h a TA, protegido de la luz.
9. Lavar 5 veces con PBS+tween 20 al 0.05%, aspirando con vacío.
10. Incubar 10min con DAPI.
11. Lavar dos veces con PBS.
12. Montar y dejar secar al menos 24h.
13. Observar en microscopio confocal Olympus FluoView™ FV1000.

Recomendaciones para análisis en eje Z (confocal):

- Bajar el láser al 1% para que no se queme la preparación
- Subir un poco el voltaje
- Bajar el tamaño del corte óptico a 0.15um
- Límite de X y Y tienen que llegar a 0.057um/pixel. Por ejemplo poner 1024 x 1024 en aspect ratio y 3.6 de zoom en 60x. Otra opción en 800 x 800 y 4.6 de zoom.
- Como rojo y DAPI no se traslapan, no es necesario que sea secuencial.
- Analizar deconvolución con algoritmo Tikhonov-Miller

Inmunohistoquímica

1. Desparafinar y rehidratar los tejidos embebidos en parafina: 25 minutos en xilol y cinco minutos en etanol absoluto, etanol al 95% y etanol al 50%.
2. Lavar con agua destilada diez minutos e incubar treinta minutos en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, para bloquear la peroxidasa endógena.
3. Recuperación antigénica con solución amortiguadora de ácido cítrico pH 6.0 calentando en horno de microondas. Dejar enfriar las laminillas e incubar en cámaras húmedas horizontales con bloqueador universal (*BioGenex*, San Ramon CA) durante 10 minutos. Posteriormente bloquear media hora con suero de borrego preparado a una dilución 1:100 en PBS.
4. Incubar con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C toda la noche.

5. Al siguiente día revelar con el Super Sensitive detection System (*BioGenex*): lavar con PBS con tween-20 al 1% durante cinco minutos dos veces. Incubar a TA con el anticuerpo secundario biotinilado (MultiLink) por 20 minutos. Lavar nuevamente cinco minutos, dos veces más e incubar con estreptavidina conjugada con peroxidasa durante 20 minutos. Después de otro lavado, revelar con aminoetilcarbazol (AEC: una gota de cromógeno AEC, en 2mL de agua destilada con 500 uL de Buffer sustrato).
6. Contrateñir con hematoxilina y montar.
7. Tomar fotografías con la cámara *Nikon DXM1200c* acoplada al microscopio *Nikon Eclipse E600* y con el software *NIS-Elements AR*.

Citometría de flujo confocal (Imaging flow cytometry)

1. Levantar células. Contar. Ajustar a una concentración final mínima de 20 millones/mL (calcular entre 2 y 4 millones para volumen final de 25uL).
2. Lavar con PBS. Resuspender en 500uL de FoxP3 FixPerm. Vortex e incubar a TA en oscuridad durante 20min.
3. Centrifugar, remover SN. Lavar con 1mL de solución amortiguadora para tinción celular. Centrifugar. Lavar con 500uL de FoxP3 Perm.
4. Resuspender en 500uL de FoxP3 Perm. Incubar a TA en oscuridad 15min, o bien, toda la noche a 4°C.
5. Centrifugar, remover SN, resuspender pellet en 100uL de FoxP3 Perm con anticuerpo primario e incubar 90min a TA.
6. Incubar con anticuerpo secundario preparado en solución amortiguadora para tinción celular 45min a TA.
7. Lavar dos veces (1mL) con solución amortiguadora para tinción celular.
8. Resuspender pellet en 20-50uL de solución amortiguadora para tinción celular. Añadir 2uL de 7-AAD si es el caso e incubar a TA en oscuridad.
9. Leer muestras en ImageStream ® (Merck). Adquirir imágenes con objetivo de 60x a baja velocidad y alta sensibilidad.
10. Analizar datos en IDEAS ® Software (Merck).

Reacción en cadena de la polimerasa

Extracción de DNA genómico de cola de ratón. Cortar un trozo pequeño de cola e incubar en

tubo de PCR con 75 uL de solución HOT-SHOT una hora a 99°C. Añadir 75 uL de solución amortiguadora de neutralización. Mezclar y almacenar en refrigeración o congelación.

PCR punto final para genotipado de ratones:

	<u>1x</u>
MgCl ₂	0.4
Buffer 10x	1
oligonucleótido sense	0.6
oligonucleótido antisense	0.6
dNTPs	0.6
H ₂ O	5.7
TaqPolimerasa	<u>0.1</u>
	9uL a cada tubo
	+1ul muestra gDNA con 20-40ng/mL

Programa:

95°	95°	Tm°	72°	72°	4°C
5'	<u>30"</u>	<u>30"</u>	<u>30"</u>	5'	-
	35 ciclos				

Tm WT=62.5°C, KO=64°C

PCR punto final para plásmido:

	<u>3.5x</u>
Buffer 10x	3.5
Primer sense	1.05
Primer antisense	1.05
dNTPs 2.5mM	2.8
H ₂ O	21.35
Taq Polimerasa	<u>0.35</u>
	9uL a cada tubo

+1ul muestra con 50ng (plásmido)

Programa:

95°	95°	62°	72°	95°	60°	72°	95°	58°	72°	95°	56°	72°	72°	4°
5'	10"	20"	4'	10"	20"	4'	10"	20"	4'	10"	20"	4'	10'	∞
	2 ciclos			2 ciclos			2 ciclos			15 ciclos				

Extracción de RNA con TRIzol. En el caso de células en cultivo, se retiró el medio y se agregó 1mL de TRIzol a cada T25 (800uL a 1pozo de caja de 6). Se pasó a un tubo eppendorf estéril y se congeló a -80°C o se continuó en el momento. En el caso de biopsias de paciente o de pulmón de ratón, los tejidos se homogenizaron y se resuspendieron en TRIzol. En ambos casos se continuó con el protocolo recomendado:

1. Agregar 200uL de cloroformo por mL de TRIzol usado.
2. Agitar en vórtex 15 segundos e incubar 3min TA.
3. Centrifugar 12000 x g 15 min a 4°C.
4. Transferir fase acuosa a un tubo nuevo.
5. Precipitar RNA con 500uL de isopropanol.
6. Incubar a TA 10min y centrifugar 9000rpm 10 min a 4°C.
7. Lavar pellet con 1mL de etanol 75%, agitar y centrifugar 8000 rpm 10min a 4°C.
8. Lavar una vez más con etanol (500uL). Centrifugar mismas condiciones.

Decantar el SN y dejar secar el pellet. Resuspender en agua tratada con DEPC.

Reacción de RT-PCR con Verso cDNA synthesis kit

	<u>1x</u>
5x cDNA synthesis buffer	4uL
dNTP mix	2uL
primers (3:1 hexamers : oligo dT)	1uL
RT Enhancer	1uL
verso enzyme mix	1uL
1ug de templado + agua	11uL
total=	20uL

Programa:

42 °C	95°C
30min	2min

Al final añadir 30uL de agua.

Reacción de RT-PCR con EXIQON RT 203301 Kit para microRNAs

	<u>1x</u>
5x reaction buffer	2uL
enzyme mix	1uL

50ng de RNA + agua	7uL
--------------------	-----

Programa:

42 °C	95°C
60min	5min

qPCR dúplex

	<u>1x</u>
Master mix	7.5uL
sonda 1	0.375
sonda 2	0.375
Agua	<u>4.75</u>
	13
	+2 uL cDNA

Programa:

95°	95°	60°
10'	<u>10"</u>	<u>45"</u>
	40 ciclos	

qPCR para microRNAs

	<u>1x</u>
Master Mix	5uL
sonda	0.4uL
Agua	0.6uL
cDNA diluido 80 veces	4uL

Programa:

95° 95° 60°
10' 10" 1'
40 ciclos

Mutagénesis dirigida. Las reacciones de mutagénesis dirigida se llevaron a cabo con el QuikChange II XL-Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). De acuerdo a las indicaciones del proveedor, pero con reacciones de la mitad del volumen indicado tal como se presenta a continuación.

	<u>1x</u>
10x reaction buffer	2.5uL
20ng dsDNA (plásmido purificado de bacterias para que esté metilado)	X uL
dNTP mix	0.5uL
QuikSolution reagent	1.5 uL
oligonucleótidos	X uL
H2O dde	X uL

(oligos + muestra + agua = 20 uL)
Reacción de 25 uL
Añadir 0.5uL de Pfu Ultra HF DNA Polymerase

Reacción de PCR 18 ciclos:

95° 95° 60° 68° 68° hielo
60" 50" 50" 390" 420" 2'
18 ciclos

Este programa fue el que se usó en KQ; sin embargo, en la reacción de EA (donde además se añadió 0.75uL de DMSO para una concentración final de 3%), por ser una región rica en GC, se usó el siguiente programa:

95° 95° 64° 68° 68° hielo
2' 50" 50" 7' 15' 2'
18 ciclos

Añadir 0.5 uL de Dpn e incubar 90min a 37°C.

Llevar a cabo transformación bacteriana con 100uL de bacterias *E. coli* competentes más 8uL de la reacción.

Extracción y análisis de proteínas

Extracción de proteína celular con RIPA

1. Lavar células con PBS frío, 2 veces.
2. Agregar buffer de lisis (RIPA con inhibidores de proteasas y PMSF): 50uL a T25, 100uL a p100.
3. Incubar 10min en hielo.
4. Raspar con policía y guardar en tubo eppendorf de 1.5mL.
5. Sonicar 3 veces con pulsos de 4 segundos y amplitud 60. Lavar sonicador con agua entre cada muestra y secar con gasa. Siempre en frío.
6. Incubar 3min en hielo, vórtex 30seg y centrifugar a 14000rpm 20 min a 4°C.
7. Recuperar SN y almacenar a -80°C.

Recuperar medios condicionados. Al recuperar medio condicionado (MC) se le añadió PMSF, se agitó y se centrifugó a 3000rpm 10min 4°C para eliminar debris. El MC se guardó en un tubo nuevo a -80°C. El MC de cultivo de 48hrs se dializó en agua con PMSF, NEM, EDTA y azida de sodio. Por cada litro de agua dde se agregaron: 1mL de PMSF 0.1M (en isopropanol), 1.25mL de NEM 2M (en etanol), 10mL de EDTA 1M (en agua dde) y 20mL de azida de sodio 1% (en agua dde). El MC dialisado se liofilizó a sequedad y se resuspendió en un volumen 100 veces menor al inicial.

Fraccionamiento núcleo-citoplasma

*Añadir inhibidores de proteasas al volumen que se vaya a usar de las soluciones CER I y NER.

*Mantener todas las muestras y extractos en hielo.

*Siempre centrifugar a 4°C.

*Mantener la relación entre CER I : CER II : NER en 200:11:100 uL.

1. Cosechar células con tripsina. Centrifugar, resuspender en 1mL de PBS y transferir a un tubo de 1.5mL para microcentrífuga.

2. Centrifugar a 500 x g (2000rpm aprox) 3 min.
3. Retirar cuidadosamente con pipeta el SN, dejando el pellet tan seco como sea posible.
4. Añadir CER I frío al pellet celular (ej. 200uL). Resuspender pellet subiendo y bajando e incubar en hielo 10min.
5. Añadir CER II frío (ej. 11 uL). Vórtex suave 5 seg o agitar con el dedo. Incubar en hielo 1min.
6. Vortex suave 5 seg o agitar con el dedo y enseguida centrifugar 5min 14000rpm. Inmediatamente transferir SN (Extracto Citoplásmico) a un tubo limpio pre-enfriado. Almacenar a -80°C.
7. Resuspender pellet en NER frío (ej. 100uL). Vórtex a máxima velocidad 15 segundos. Colocar en hielo y continuar vortexeando 15seg cada 5 o 10 min durante 40 min.
8. Centrifugar 10min a 14000rpm.
9. Inmediatamente transferir SN (extracto nuclear) a un tubo limpio pre-enfriado. Almacenar a -80°C.

Disgregación celular en cinco fracciones

Este fraccionamiento se realizó con el Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific, 78840).

*Mantener todas las muestras y extractos en hielo a menos que se indique lo contrario.

*Siempre centrifugar a 4°C.

* Preenfriar los tubos.

1. Levantar células, lavar con PBS, transferir a tubo eppendorf de 1.5mL, resuspender en 120uL de solución para extracto citoplásmico CEB con inhibidores de proteasas. Incubar diez minutos a 4°C en termomixer a 300 rpm. Centrifugar a 500 g cinco minutos. Transferir sobrenadante a tubo nuevo (extracto citosólico).
2. Lavar pellet con 50uL de CEB, centrifugar a 500 g cinco minutos y desechar sobrenadante. Este paso es para evitar contaminación en los siguientes extractos. Resuspender pellet en 120uL de solución para extracto membranal MEB con inhibidores de proteasas. Mezclar con vórtex a máxima velocidad cinco segundos. Incubar diez minutos a 4°C en termomixer a 300rpm. Centrifugar a 3000 g cinco minutos. Transferir sobrenadante a tubo nuevo (extracto membranal).

3. Resuspender pellet en 60uL de solución para extracto nuclear NEB con inhibidores de proteasas. Mezclar con vórtex a máxima velocidad durante quince segundos. Incubar 30 minutos a 4°C en termomixer a 300 rpm. Centrifugar a 5000 g cinco minutos. Transferir sobrenadante a tubo nuevo (extracto de proteínas nucleares solubles).
4. Resuspender pellet en 60uL de NEB con inhibidores de proteasas, CaCl₂ 100mM y 300U de nucleasa micrococcal. Mezclar con vórtex a máxima velocidad durante quince segundos. Incubar 15 minutos a TA. Volver a mezclar con vórtex a máxima velocidad durante quince segundos. Centrifugar a 21000 g cinco minutos. Transferir sobrenadante a tubo nuevo (extracto de proteínas nucleares unidas a cromatina).
5. Resuspender pellet en 60uL de solución para extracto de citoesqueleto CySE con inhibidores de proteasas. Mezclar con vórtex a máxima velocidad durante quince segundos. Incubar 10 minutos a TA. Centrifugar a 21000 g cinco minutos. Transferir sobrenadante a tubo nuevo (extracto de proteínas de citoesqueleto).

Western blot

1. Separación de proteínas por electroforesis. Preparar geles y montar cámara de electroforesis con solución amortiguadora de corrida 1x. Preparar muestras con solución amortiguadora muestra con 2-mercaptoetanol. Hervir 5 minutos. Bajar en nanofuga. Cargar geles y correr en frío a 140V-150V, 400mA con 2 geles (1 a 2h). Retirar geles con espátula y equilibrar en solución amortiguadora de transferencia. Cortar membrana al tamaño del gel (8cm x 6cm). Si se usa de nitrocelulosa: pre-hidratar en agua 30" y equilibrar. Si se usa de PVDF, sumergir en metanol 1min, enjuagar en agua 5min y equilibrar.
2. Transferir.
 - 2a. En cámara húmeda sobre el lado negro del cassette: a) esponja negra, b) papel filtro, c) gel, d) membrana, e) papel filtro, f) esponja negra. Eliminar burbujas con varilla de vidrio. Transferir en frío con cartucho de hielo. Una hora para dos geles, 30min para 1 gel. 100V.
 - 2b. En cámara semiseca colocar sobre la plancha: a) papel filtro, b) membrana, c) gel, d) papel filtro. 20min para 1 gel, 45min para 2 geles. 15V.
3. Inmunodetección y revelado. Bloquear sitios no específicos incubando la membrana en leche al 5% en TBS-T 1h TA, o bien, toda la noche a 4°C, en agitación (columpio). Retirar solución bloqueadora e incubar con anticuerpo primario 2h TA, o bien, toda la noche a 4°C, en agitación (columpio). Lavar la membrana con TBS-T; por ejemplo: 3 veces 10min. Incubar

con anticuerpo secundario 1h TA (HRP). Lavar nuevamente con TBS-T. Eliminar exceso de buffer, añadir la mezcla 1:1 de solución de revelado con pico luminol. Incubar 1min TA. Retirar exceso de luminol. Adquirir imágenes con fotodocumentador ChemiDoc XLS (BioRad). Si es necesario, repetir con femto luminol. Analizar con el software ImageLab.

Inmunoprecipitación

Prelavar lisado celular.

1. Tomar 400µg de proteína (100µg por condición), añadir 5µl de control de isotipo e incubar a 4°C, 1h, en agitador para tubos (overhead shaker).
2. Preparar 50µl de perlas de agarose A. Recordar cortar la punta de la pipeta para evitar romper las perlas. Centrifugar perlas a 4°C, 2500G durante 3min. Descartar sobrenadante. Equilibrar perlas con 50µl de RIPA. Centrifugar perlas a 4°C, 2500G durante 3min. Descartar sobrenadante. Repetir lavado dos veces. Para el último paso resuspender en RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasas.
3. Agregar las perlas al lisado con isotipo e incubar a 4°C, 20min. Centrifugar a 4°C, 14000G durante 10min.

Unión con anticuerpo

1. Distribuir el lisado prelavado en tubos donde se coloquen 100µg de proteína y el anticuerpo de control de isotipo o el de interés. Apartar en congelación otro tanto para input (S1).
2. Llevar muestras a 120µl con RIPA con inhibidores para asegurar incubación apropiada. Incubar toda la noche a 4°C.

Pull-down

1. Preparar perlas de agarosa A como previamente se prepararon (25µl/reacción).
2. Añadir 25µl de perlas a cada tubo e incubar 2h a 4°C, 2h. Centrifugar a 4°C, 2500G durante 5min. Remover sobrenadante. Determinar volumen y mantener para WB como "sobrenadantes" (S2-S4).
3. Lavar pellet con 50µl de RIPA con inhibidores. Centrifugar a 4°C, 2500G durante 5min. Remover sobrenadante y resuspender pellet en 80µl de Lämmli ("pellets" S2-S4).
4. Añadir buffer Lämmli buffer al Input y a los sobrenadantes. Hervir muestras 5min a 95°C. Centrifugar "pellets" a 14000rpm durante 10min para que se sedimenten las perlas, transferir sobrenadante a tubos nuevos y congelar.

5. El gel para WB se puede cargar como sigue: PM, S1, SN S2, P S2, SN S3, P S3, SN S4, PS4.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Se utilizó el kit para ChIP de Cell Signaling 9003. A continuación se resumen las recomendaciones:

1. Entrecruzamiento de DNA-proteínas. Levantar células, lavar con PBS con PMSF e incubar 10 minutos a TA en medio sin suero con formaldehído a una concentración final del 1% (por ejemplo 10mL de medio con 270uL de formaldehído al 37%). Agregar glicina 10x e incubar 5 minutos a TA. Centrifugar células, lavar dos veces con PBS con PMSF y resuspender en solución amortiguadora A fría con inhibidores de proteasas, PMSF y DTT. Incubar en hielo diez minutos mezclando por inversión cada tres minutos. Centrifugar núcleos 5 minutos a 3000 rpm a 4°C, resuspender en solución amortiguadora B fría con inhibidores de proteasas, PMSF y DTT. Centrifugar de nuevo y resuspender en misma solución pero en 1mL para transferir a eppendorf de 1.5mL.
2. Digestión. Agregar nucleasa micrococcal e incubar 20 minutos a 37°C, mezclar por inversión cada cuatro minutos. Detener digestión agregando EDTA 0.5 M. Centrifugar a 13000 rpm durante un minuto a 4°C. Resuspender pellet en solución amortiguadora ChIP 1x con inhibidores y PMSF e incubar en hielo 10 minutos. Dar doce pulsos de cuatro segundos en el procesador ultrasónico con amplitud 60 incubando en hielo 30 segundos entre cada uno.
3. Centrifugar 10 minutos a 10000rpm a 4°C. El sobrenadante es la preparación de cromatina entrecruzada con proteínas y se debe almacenar a -80°C hasta que se utilice.
4. Analizar digestión de cromatina. Tomar 50uL de muestra de cromatina y agregar 100uL de agua libre de nucleasas, 6uL de NaCl 5M y 2uL de RNasa A. Mezclar en vórtex e incubar 30 minutos a 37°C. Agregar 2uL de proteinasa K, mezclar en vórtex e incubar dos horas a 65 °C. Purificar DNA con columnas o con técnica fenol-cloroformo y verificar tamaño del DNA genómico fragmentado mediante gel de agarosa al 1%.
5. Precipitar cromatina. A 400uL de solución amortiguadora ChIP 1x con inhibidores, agregar 100uL de la solución de cromatina (paso 3) y el anticuerpo correspondiente: MMP28, Histona H3 control positivo o IgG control negativo. Incubar en rotación

30 minutos a TA. Agregar perlas magnéticas e incubar toda la noche a 4°C. Almacenar por separado 20uL de cromatina diluida (input).

6. Lavar y eluir. Bajar perlas magnéticas con imán, esperar uno a dos minutos, retirar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender en 1mL de solución baja en sales (300 uL de solución amortiguadora CHIP + 2.7 mL de agua). Incubar cinco minutos en rotación a 4°C y repetir para un total de tres lavados. Resuspender en 1mL de solución alta en sales (100uL de solución amortiguadora CHIP + 900 uL de agua). Incubar cinco minutos en rotación a 4°C y bajar perlas con imán. Agregar 150uL de solución de elución CHIP e incubar 30 minutos a 65°C a 1200 rpm. Bajar perlas con imán. Transferir sobrenadante con cromatina eluída a un tubo nuevo. Agregar a cada tubo, incluyendo el del input, 6uL de NaCl 5M y 2uL de proteinasa K e incubar dos horas a 65°C. Purificar DNA con columnas.

El siguiente paso correspondería a la PCR para el DNA eluído; sin embargo, en este caso lo que se deseaba era hacer CHIP-seq, por lo que se procedió a analizar el DNA mediante gel de acrilamida.

Nombre del Investigador:	Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas
Institución:	Instituto Nacional de Medicina Genómica
Prueba:	PERFIL GENÉTICO DE STR PARA VERIFICAR LA AUTENTIFICIDAD DE LÍNEA CELULAR HUMANA
Metodología:	Reacción en cadena de la polimerasa tipo multiplex y electroforesis capilar en el Analizador Genético 3130xl de AB, análisis de fragmentos Gene Mapper ID v3.2
Marcadores genéticos utilizados:	Pequeñas repeticiones en tandem (STR) autosómicos: CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA y el gen de amelogenina
Tecnología:	ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop v3.2.1 Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplification
Recepción de la muestra: 25 de Marzo del 2014, 12:20 horas Emisión del resultado: 27 de Marzo del 2014, 13:02 horas	

LÍNEA CELULAR	A549		PERFIL GENÉTICO PREVIAMENTE REPORTADO PARA:	
NO. CASO LDG	00252		PERFIL GENÉTICO PREVIAMENTE REPORTADO PARA:	
ID MUESTRA LDG	252		PERFIL GENÉTICO PREVIAMENTE REPORTADO PARA:	
Marcador	PERFIL GENÉTICO OBTENIDO:		Marcador	A549 (ATCC® CCL-185™)
D8S1179	13	14	D8S1179	
D21S11	29		D21S11	
D7S820	8	11	D7S820	8 11
CSF1PO	10	12	CSF1PO	10 12
D3S1358	16		D3S1358	
TH01	8	9.3	TH01	8 9.3
D13S317	11		D13S317	11
D16S539	11	12	D16S539	11 12
D2S1338	24		D2S1338	
D19S433	13		D19S433	
vWA	14		vWA	14
TPOX	8	11	TPOX	8 11
D18S51	14	17	D18S51	
D5S818	11		D5S818	11
FGA	23		FGA	
Amelogenina	X	Y	Amelogenina	X Y

Reporte interpretado:

Se analizó ~ 1 ng/PCR del DNA obtenido de la muestra A549 wt, obteniendo un electroferograma de buena calidad (relación fragmento/ruido), que detectó y nombró automáticamente los alelos que se reportan, no se detectó, ni se observó ninguna señal adicional o diferente a las reportadas.

El perfil genético obtenido de la muestra identificada como A549 wt (caso número en LDG-INMEGEN: 00252, ID muestra: 252) comparte los 15 alelos reportados para la línea celular A549 (ATCC® CCL-185™), con una concordancia del 100% por lo que se puede concluir que la muestra analizada son células de A549 (ATCC® CCL-185™), no se detectaron otros alelos diferentes a los reportados, que pudieran indicar que la muestra analizada esta contaminada con otro tipo de células humanas.

Nota: El INMEGEN no obtuvo las muestras ni verificó la identidad de las mismas, por lo que el LDG-INMEGEN es responsable del resultado reportado bajo la información proporcionada. La veracidad de la información proporcionada o la autenticidad de las muestras es responsabilidad del cliente.

Reporte obtenido a través de Internet para fines de consulta. Sin validez para fines legales.

<http://www.atcc.org/products/all/HTB-77.aspx#specifications>



M. en C. Beatriz E. Villegas Torres
Laboratorio de Diagnóstico Genómico
Dirección de Investigación, INMEGEN

Upregulation and nuclear location of MMP28 in alveolar epithelium of Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Running title: MMP28 in IPF

Mariel Maldonado¹, Alfonso Salgado-Aguayo², Iliana Herrera², Sandra Cabrera¹, Blanca Ortíz-Quintero², Claudia A. Staab-Weijnitz³, Oliver Eickelberg^{3,4}, Remedios Ramírez¹, Anne M. Manicone⁵, Moisés Selman², Annie Pardo¹.

1. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico city, Mexico.
2. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico city, Mexico.
3. Comprehensive Pneumology Center, Helmholtz Zentrum München, Member of the German Center of Lung Research (DZL), Munich, Germany.
4. Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, School of Medicine, University of Colorado, Denver, United States.
5. Department of Medicine, Center for Lung Biology, University of Washington, Seattle, Washington, United States.

Correspondence

Annie Pardo PhD

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad de Mexico, Mexico

Telephone: (52 55) 56233822

E-mail: apardos@unam.mx

Mariel Maldonado is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 275771 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT).

Sources of support: This research was partially supported by UNAM PAPIIT: IN218516 and CONACYT 251636.

Author contributions:

M.M., A.P., conceived and designed the study. M.M. performed the bulk of the experiments. A.S.-A., I.H., B.O.-Q., R.R., assisted data acquisition. **C.A.S.-W., O.E.** provided IPF lung samples and human primary basal bronchial epithelial cells. S.C. conducted the experiments involving mice. M.M., A.S.-A., I.H., B.O.-Q., **C.A.S.-W., O.E., A.M.M,** M.S, A.P. participated in analysis of data. M.M., M.S., A.P. interpreted and discussed the data and wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

ABSTRACT

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a chronic and progressive aging-associated disease of unknown etiology. Growing body of evidence indicates that aberrant activated alveolar epithelial cells induce the expansion and activation of the fibroblast population leading to the destruction of the lung architecture. Some Matrix Metalloproteinases (MMPs) are upregulated in IPF, indicating that they may be important in the pathogenesis and/or progression of IPF. Here, we studied the expression of MMP28 in this disease and evaluated its functional effects in two alveolar epithelial cell lines and in human primary bronchial epithelial cells. We found that the enzyme is expressed in bronchial (apical and cytoplasmic localization) and alveolar epithelial cells (cytoplasmic and nuclear localization) in two different IPF groups of patients. *In vitro*, MMP28 epithelial silencing decreased the proliferation rate and delayed wound closing, while overexpression showed the opposite effects, protected from apoptosis and enhanced epithelial-mesenchymal transition (EMT). Our findings demonstrate that MMP28 is upregulated in epithelial cells from IPF lungs where it may play a role in increasing the proliferative and migratory phenotype in a catalytic-dependent manner.

Key words: MMP, lung epithelial cells, IPF

Abbreviations: Alveolar Epithelial Cells (AEC), Bronchial Epithelial Cells (Airway epithelial cells: BEC), Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), Immunohistochemistry (IHC), Immunofluorescence (IF), Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF), keratin 5 (krt5), Matrix Metalloproteinase-28 (MMP28), wildtype (WT).

INTRODUCTION

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a progressive and aging related fibrosing interstitial pneumonia of unknown etiology (1-4). IPF is a complex epithelial-driven disorder where genetic, epigenetic and environmental factors interact triggering the aberrant activation of lung epithelium. In turn, hyperactivated alveolar epithelial cells produce numerous mediators that result in an increase of the fibroblast/myofibroblast population, excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) and the destruction of lung architecture (1, 2, 5, 6).

From the complex pathways likely involved in the pathogenesis of IPF, deregulation in the expression of numerous Matrix Metalloproteinases (MMPs) has been consistently reported suggesting that they may be important in the pathogenesis and/or progression of IPF (7). MMPs are a family of zinc-dependent endopeptidases with 23 members in the human. These enzymes not only cleave ECM components, but also cytokines, growth factors, receptors and other bioactive molecules participating in cellular processes such as differentiation, proliferation and angiogenesis (8).

In 2001, the last member of the human MMP family was discovered simultaneously by two research groups (9, 10). MMP28 (epilysin) is expressed during development and regeneration of nervous system before myelination and in this circumstances, three substrates, still the only ones described for MMP28 so far, have been suggested: neural cell adhesion molecule (NCAM), nogo A and neuregulin (11). MMP28 mRNA has been found in many human epithelia, thus a role in homeostasis has been suggested (9). MMP28 has also been revealed in some pathological conditions including osteoarthritis and gastric carcinoma (12, 13). In murine lung, it has been demonstrated that MMP28 is expressed by Club cells (14) promoting epithelial cell survival *in vitro* and in a model of influenza infection (15). Loss of Mmp28 in mice results in reduced macrophage polarization to M2 phenotype and attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis (16). More recently, it was found that Mmp28 deficient mice are also protected from tobacco-smoke induced inflammation and emphysema suggesting a role in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (17).

However, this enzyme has not been studied in human fibrotic lung disorders. In this context, the aim of this study was to evaluate the expression and localization of MMP28 in IPF, and analyze its functional effects in alveolar and airway epithelial cells *in vitro*.

MATERIALS and METHODS

Human samples

The human samples were obtained under protocols approved by the local ethics committees and all participants gave written informed consent. Samples from ~~the~~ 17 Mexican ~~cohort~~ patients were obtained at Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Samples from ~~the~~ 9 German ~~cohort~~ patients were kindly provided by the CPC-M BioArchive at the Comprehensive Pneumology Center. Some demographic characteristics of the patients are included in table E1. Four liquid nitrogen-frozen tissues from IPF patients and four from donors, were homogenized using a microdismembrator (Sartorius) and lysed with RIPA buffer for protein isolation and western blot analysis, as described previously (18).

Cell culture

Human alveolar epithelial cell line A549 (AEC) and rat alveolar epithelial cell line RLE-6TN (rat AEC) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Human primary alveolar epithelial cells type II (19) (kindly donated by Melanie Königshoff) and human primary basal bronchial epithelial cells (BEC) had been isolated from a histologically normal tumor-free region of a lung tumor resection and were provided by the CPC-M BioArchive at the Comprehensive Pneumology Center. All cells were cultured in an incubator (5% CO₂- 95% air) at 37°C. Cells were lysed with RIPA buffer, or cytoplasmic and nuclear enriched fractions were obtained with the NE-PER kit (78835, Thermo Scientific).

Silencing and overexpression

Silencing of MMP28 in AEC was performed using lentiviral particles (Santa Cruz) with scrambled control shRNA (sc-108080) or shMMP28 (sc-62278-V). For silencing of MMP28 in BEC, reverse transfection was achieved with scrambled siRNA (AM4611,

Ambion) or siMMP28 (s35627, Ambion). For overexpression, AEC and rat AEC were transfected with empty vector pCMV6-Entry (Mock, PS100001, Origene), fusion MMP28-DDK (MMP28, RC215325, Origene), catalytically inactive MMP28-DDK (EA) or KQ mutated MMP28-DDK (KQ).

For **imaging** and **western blot**, see supplementary methods.

Functional Effects

Functional effects were evaluated according to the supplier's recommendations for each test. *Growth rate* was studied with the WST-1 reagent (Roche). *Proliferation rate* was measured with the CyQUANT reagent (Thermo Fischer Scientific). Early *apoptosis* was determined with Annexin V by flow cytometry through the externalization of phosphatidylserine. *Wound assay* was performed as previously reported (20). *Transmigration* was evaluated with Collagen I coated 8µm transwells using 50ng/mL of EGF as chemoattractant (QCM Haptotaxis Cell Migration Assay – Collagen1, Colorimetric ECM582 Millipore). See supplementary methods for details.

Murine pulmonary fibrosis model

C57BL/6 wild type and Mmp28 deficient mice were kindly provided by Anne Manicone. The generation of the mice is described in (14). The mice were housed in specific pathogen-free conditions. All experiments were approved by the Ethics Committee at INER. Pulmonary fibrosis was induced by a single intratracheal instillation of 10mg of bleomycin sulfate (Cayman chemical) in 50uL of saline solution. Control groups received only the vehicle. Mice were sacrificed at 14 days after instillation. Left lungs were frozen and consigned for hydroxyproline determination. Right lungs were fixed with 4% paraformaldehyde for immunohistochemistry and staining with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome.

Statistics

All experiments were performed three times by triplicate, unless stated otherwise. Results are given as mean \pm SD, if not mentioned otherwise. ANOVA with Tukey or Dunnett's

adjustment for multiple comparisons was applied. $P < 0.05$ was considered significant. Results were analyzed with GraphPad Prism version 5.

RESULTS

MMP28 is upregulated in IPF lungs and expressed by epithelial cells

Dataset from previous research suggested that MMP28 gene expression was increased in IPF lungs compared to controls (21). To validate this finding at the gene and protein level, lung tissue samples from IPF (n=7) and control donors (n=6) were analyzed by qRT-PCR and western blot. As illustrated in **Figure 1**, MMP28 showing bands of ~58 (proenzyme), ~48 and 46 kDa representatives of the molecular weight of the active enzyme was significantly increased in IPF ($p<0.01$). No significant differences were found by qRT-PCR (not shown).

Cellular localization of MMP28 in IPF and control lungs was examined by IHC and IF. MMP28 was mostly expressed by alveolar epithelial cells (AEC) in IPF, (**Figure 2 B, D, J, L**) and it was weakly expressed by the normal alveolar epithelium (**Figure 2 A, C, I, K**).

In addition to a cytoplasmic localization, a notable nuclear staining was found in AEC (**Figure 2 D, L**). MMP28 was also observed in airway epithelial cells, (**Figure 2 F, N, P**), which were identified by CC10 expression. Here, the staining was mainly apical and sometimes cytoplasmic.

To confirm the nuclear location of MMP28 in AEC, Z-stacks were obtained with confocal microscopy which demonstrated that the staining of MMP28 was inside the nucleus in some cells of IPF lungs (**Figure E1 A, B**) while in others it was perinuclear (**Figure E1C**). MMP28 was also observed to be coexpressed with keratin 5 (krt5) in some areas (**Figure 2 J, L**). Although krt5 has been mainly described in progenitor airway epithelial cells (22), recent single-cell research performed in IPF lungs has demonstrated that alveolar epithelial cells show an aberrant phenotype, displaying both airway and alveolar proteins (23). As shown in **Figure E1E**, A549 alveolar epithelial cells also express krt5. To further corroborate the nuclear expression by alveolar epithelial cells *in vivo*, IPF lungs were costained with SP-C and MMP-28 and examined by immunofluorescence (**Figure 2 S**).

Intracellular localization of MMP28 in alveolar and bronchial epithelial cells *in vitro*

To evaluate whether MMP28 is present in the nucleus of lung epithelial cells *in vitro*, we performed IF of fixed A549, and primary alveolar and bronchial epithelial cells (BEC). In the case of the A549 cell line, many of them showed cytoplasmic signal, but in some cells a clear nuclear localization was observed (**Figure 3 A, B**), which was confirmed by the z-stacks (**Figure 3 C**). Nuclear localization was also observed in some primary human AEC (**Figure 3 D**). In primary human differentiated bronchial epithelial cells MMP28 was only detected in the cytoplasm, colocalizing with the endoplasmic reticulum protein ERp57 (**Figure 3 E, F**). This finding correlates with our observations *in vivo* (IHC and IF).

To verify the intracellular MMP28 localization in AEC, nuclear and cytoplasmic fractions of A549 native cells were obtained. As shown in **Figure 3 G** the presence of the enzyme in the nuclear fraction was confirmed. A ~48-50 kDa band likely representing the active form of the enzyme was revealed in the nuclear compartment, while in the cytoplasmic portion a ~60-62kDa band, probably representing the proform, was observed.

Looking for a possible MMP28 nuclear translocation mechanism we performed an *in silico* analysis using two different software tools (see supplementary methods). Both revealed the same likely nuclear localization signal (NLS): 112-RHRTKMRRKKR-122 (Prediction cutoff 0.7). To find out whether the mechanism to enter the nucleus depends on this putative NLS, we performed site-directed mutagenesis to change lysines to glutamines in the NLS (K116Q, K120Q and K121Q, polar amino acids with similar molecular weight and no charge). A549 cells were transfected either with DDK-tagged MMP28 (WT-MMP28), or with DDK-tagged MMP28 mutant (KQ-MMP28) or empty vector (Mock, PS100001 Origene).

Cells were analyzed by imaging flow cytometry with an anti-DDK antibody. **Figure E2A** shows that ~24% of the cells transfected with the KQ-MMP28 present a nuclear location of the protein with no significant differences with the WT-MMP28 transfected cells (~ 29%). Likewise, analyzing Mock, WT-MMP28 and KQ-MMP28 cells with anti-MMP28, which binds to the transfected protein as well as to the endogenous protein, we found that around 30% of Mock cells lacking transfected protein showed a nuclear location of MMP-28 that increased to 45% in the transfected cells. **Figure E2B** illustrates a representative image of Mock, WT-MMP28 and KQ-MMP28 cells with nuclear or cytoplasmic localization of the enzyme.

Effects of overexpression and silencing of MMP28 *in vitro*

In order to analyze the possible role of MMP28 in AEC and BEC, human A549 cell line, rat RLE-6TN alveolar epithelial cell line (rat AEC), and primary human BEC were used. AEC (A549 and RLE-6TN) were transfected with human WT MMP28 DDK tag (*MMP28*) (**Figure E3 A, B, E, F**). While intracellular MMP28 levels were moderately increased, extracellular MMP28 was drastically increased. Additionally, MMP28 was silenced in A549 cells using shRNA (*shMMP28*) achieving 80% of efficiency at RNA level and 70% at protein level in one of the clones (**Figure E3 C, D**). Also, MMP28 expression in primary human BEC was transiently decreased with siRNA (*siMMP28*) getting around 70% of knockdown efficiency from 24 to 72 hours of culture (**Figure E3 G, H**).

MMP28 increases proliferation and growth rate ~~and protects from apoptosis~~

Overexpression of MMP28 in AEC significantly increased their growth and proliferation rates compared with their controls ($p < 0.001$). By contrast, when MMP28 was silenced, growth and proliferation rates significantly decreased ($p < 0.001$) (**Figure 4 A, B**). Similarly, the transfection of human MMP28 to rat AEC significantly increased their growth and proliferation rates compared with Mock ($p < 0.001$) (**Figure E4 A, B**). Regarding primary human BEC, when MMP28 was silenced a significant decrease in growth and proliferation rates was also observed ($p < 0.001$) (**Figure E4 C, D**).

We examined whether nuclear MMP-28 colocalized with the proliferation biomarker phospho-Histone H3 (Ser10, pH3). As illustrated in **figure 4C and D**, some IPF epithelial cells showed nuclear colocalization of MMP-28 and pH3.

MMP28 protects epithelial cells from apoptosis, promotes migration and enhances epithelial to mesenchymal transition.

Given that the growth rate includes cell proliferation and cell death, the effect of MMP28 on apoptosis was also evaluated using bleomycin as an apoptotic stimulus. As shown in **Figure 5 A**, MMP28 overexpression significantly protected AEC from apoptosis ($p < 0.05$), while silencing the enzyme induced an increase in apoptosis ($p < 0.01$).

Cell migration was evaluated by the scratch wound healing assay. As shown in **Figure 5B**, at 48h, in A549 cells transfected with MMP28 the wound closed $94.5\pm 4\%$ while healing was only $70.7\pm 3\%$ using Mock cells. By contrast, MMP28 silenced cells delayed this process with $52\pm 6.8\%$ of wound extension at 48h. There was no significant difference between Mock and shCtrl cells. Likewise, overexpression of MMP28 in rat AEC accelerated wound closing $88.56\pm 3.6\%$ versus $55.15\pm 14.46\%$ in Mock cells at 12h (**Figure E5 A**), while silencing of MMP28 in BEC delayed wound closing at 18h to $40\pm 16\%$ versus $74.7\pm 6.5\%$ obtained with the scrambled RNA treated cells (**Figure E5 B**).

Transmigration of AEC performed in Boyden chambers covered with collagen I revealed that overexpression of MMP28 increased transmigration in $42\pm 4\%$ ($p<0.001$), while silencing of MMP28 decreased it in $26\pm 10.7\%$ ($p<0.01$) (**Figure 5C**).

There have been contradictory results regarding a putative role of MMP28 on epithelial-mesenchymal transition (EMT) (15, 24). We tested this effect on A549 epithelial cells. We observed that the expression of E-cadherin (as an epithelial marker) in MMP28 transfected cells was remarkably decreased compared with Mock transfected cells under basal conditions, and when stimulated with TGF β 1 for two days this effect was amplified (**Figure 5D**). The presence of fibronectin as a mesenchymal marker was observed until the fourth day of TGF β 1 stimulation, and with the overexpression of MMP28 the intensity of the fibronectin band increased (**Figure 5E**).

Effects of MMP-28 on migration and proliferation are catalytic-dependent

In order to test if the functional effects observed were due to the catalytic activity of MMP28, site-directed mutagenesis was performed based on previous reports (15, 24) to change the glutamate in the catalytic site for an alanine (E241A, see Methods). Human AEC and rat AEC were transfected with the EA mutant MMP28 and the experiments evaluating functional effects were repeated. As shown in **Figure 6A-D**, the increase in growth rate and the accelerated wound closure observed in cells transfected with WT MMP28 are not preserved in cells transfected with the EA mutant MMP28. Consequently, these are catalytic-dependent effects of MMP28.

Analysis of Mmp28 in the murine model of pulmonary fibrosis

As reported before (14), in healthy mice lungs Mmp28 is expressed by airway epithelial cells, but also by some AEC. At 14 days after bleomycin injury, immunoreactive Mmp28 expression was observed in addition to epithelium in intra-alveolar macrophages ((Figure 7A). After 14 days of bleomycin instillation, we observed a significant increase of Mmp28 at the protein level (Figure 7B).

It has been previously reported that *Mmp28*-deficient mice showed a modest reduction of collagen accumulation at days 14 and 21 after low dose of bleomycin injury (16). With the usual dose that we utilize, we corroborated that *Mmp28* *-/-* mice develop less fibrosis at day 14 of the fibrotic phase of the model. In panel 7C representative images of Masson's trichrome are shown and a significantly lower hydroxyproline content in lungs of *Mmp28*-deficient mice was observed (Figure 7D).

To confirm our results with epithelial cell lines, we isolated primary lung epithelial cells from WT and *Mmp28* *-/-* mice and performed transmigration assays in Boyden chambers covered with collagen I. As shown in Figure 7E we revealed that cells from *Mmp28*-deficient mice showed significant less migration compared with WT mice.

DISCUSSION

IPF is a complex disorder where the interaction of aging and multiple genetic and environmental risk factors results in the hyperactivation of the alveolar epithelium that triggers an aberrant wound healing response to repetitive lung micro-injuries. In this pathological process, a variety of mediators such as growth factors, cytokines, chemokines and coagulation factor receptors are involved (1, 2). In this context, a growing body of evidence supports a critical role of MMPs either releasing or activating growth factors such as TGF β , or actively participating in lung remodeling processes. Most of them are expressed by the aberrantly activated alveolar epithelium, and may play profibrotic (e.g. MMP-7), or antifibrotic roles (e.g., MMP-19) (25, 26).

In this study, we focused on MMP28, the last revealed member of the MMP family. This enzyme has the typical structural domains of the MMPs consisting of a signal peptide at the N-terminus that leads it through the secretory pathway, a prodomain that keeps it as zymogen, a catalytic domain with a Zinc ion, and a hinge region that is adjacent to the four hemopexin-like domains in the C-terminus. Between the prodomain and the catalytic domain it has the RKKR motif classically recognized by proprotein convertases; however, MMP28 is not identified by furin at this site but at an upstream YGYL motif (specifically at the Y45L46) in the prodomain (27).

In the present study we examined the expression, localization and possible functions of MMP28 in IPF, a usually progressive and irreversible epithelial-driven fibrosis. We found that the enzyme is mainly expressed by the lung epithelium, specifically by alveolar and bronchial epithelial cells. Interestingly, immunohistochemical detection with four different antibodies revealed that, in some alveolar epithelial cells, MMP28 localized in the nuclei, a finding that was confirmed with z-stacks from human tissues and cultured cells. The enzyme was also observed in the nuclei of krt5+ (likely) progenitor cells that have been recently found in fibrotic areas of IPF lungs (22), and in the nuclei of proSP-C positive cells, a biomarker of alveolar epithelial cells type II. By contrast, in BEC, MMP28 staining was mostly apical. It is important to emphasize that in IPF, many lung epithelial cells acquire aberrant, multilineage-like states and some of them share characteristics of both

conducting airway and alveolar epithelial cells (23). Moreover, the A549 cell line that was used in this study also expressed krt5.

Notably, while Mexican IPF biopsies were obtained from patients at the time of diagnosis, German IPF samples were explants obtained during lung transplantation, thus representing end-stage disease, indicating that the epithelial expression of this enzyme is maintained during the progression of the disease.

The roles of MMPs have mostly been described in the extracellular environment; however, some of them have been previously found in intracellular compartments, such as nuclei and mitochondria (20, 28-34). Specifically, nuclear localization has been shown for MMP2, MMP3, MMP12 and MMP14, where these proteins have been proposed to have certain roles as transcriptional (co)factors or as apoptosis-related proteases (35-41). Nevertheless, a nuclear localization of MMP28 has not been reported before.

There are some studies showing that nuclear translocation of MMPs may be dependent of new NLSs found in their sequences (35, 36, 40). In the case of MMP28, a putative NLS was found between the prodomain and the catalytic domain. Nevertheless, changing the lysines for glutamines in the putative NLS did not modify the localization of the enzyme suggesting that this sequence is not a real NLS, thus MMP28 nuclear translocation deserves further studies.

The putative role of epithelial expression of MMP28 in IPF is presently unclear. By gain-and-loss experiments, we found that the enzyme increases epithelial growth rate, proliferation and migration. Interestingly, we found that in IPF lungs epithelial nuclear MMP28 colocalizes with the marker of proliferation phospho histone H3 suggesting that it might be related to a proliferative phenotype, one of the features described in a subset of IPF epithelial cells. Additionally, we confirmed that MMP28 confers resistance to apoptosis as previously reported (15).

These functions were lost when the catalytic domain was affected by site-directed mutagenesis changing the glutamate in the catalytic site for an alanine. This finding supports the hypothesis that the catalytic activity of MMP28 promotes an invasive phenotype in AEC as suggested previously (24). In fact, in gastric carcinoma and in several gastric cancer cell lines, MMP28 is increased and correlates with a greater invasive

phenotype (13). Regarding the role of MMP28 in EMT, contradictory results have been documented (15, 24). Our results indicate that this enzyme enhanced this process and interestingly we found that while the epithelial marker E-cadherin was modified earlier, the mesenchymal marker fibronectin appeared only after four days of TGF- β stimulation in the MMP28 transfected cells.

The finding that the increase in proliferation and wound closure was observed not only in AEC, but also in BEC suggest that these effects are not only related with the nuclear MMP28. Future approaches are necessary to identify protein binding partners and/or target DNA sequences, and should include high throughput proteomics in order to analyze substrates as well as the signaling pathways of the effects we have described.

Taking together, our findings indicate that MMP28 is expressed in the IPF lungs mainly by epithelial cells enhancing survival, proliferation/migration and EMT. Some of these processes characterize the aberrantly activated epithelial cells in IPF. However, the pathological result of these effects in vivo is presently unclear.

MMP28 has been described as profibrotic in the bleomycin-induced lung injury model (16). Recently, MMP28 has also been implicated in the pathogenesis of tobacco-smoke induced emphysema (17). In both experimental murine models, Mmp28 was expressed primarily by lung macrophages. We found that Mmp28 is also expressed by alveolar epithelial cells and corroborated the profibrotic role in the model. Moreover, we found that Mmp 28 $-/-$ lung epithelial cells displayed a less migratory phenotype versus WT cells.

In conclusion, our study demonstrated the up-regulation of MMP28 in IPF lungs where it is expressed in bronchial (*apical and cytoplasmic localization*) and alveolar epithelial cells (*cytoplasmic and nuclear localization*) in two different IPF groups of patients cohorts. *In vitro* MMP28 protects lung epithelial cells from apoptosis, increases proliferation and migration, and enhances EMT in a catalytic-dependent manner.

Acknowledgments

Jorge García-Alvarez, Fien M. Verhamme, Mariana Maciel, Miguel Gaxiola.

References

1. King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011;378:1949-61.
2. Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. An integral model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:1161-72.
3. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schönemann HJ; ATS/ERS/JRS/ALAT. Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:788-824.
4. Thannickal VJ, Murthy M, Balch WE, Chandel NS, Meiners S, Eickelberg O, Selman M, Pardo A, White ES, Levy BD, Busse PJ, Tudor RM, Antony VB, Sznajder JI, Budinger GR. Blue journal conference. Aging and susceptibility to lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191:261-9.
5. Selman M, King Jr TE, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann Intern Med*. 2001;134:136-151.
6. Selman M, López-Otín C, Pardo A. Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2016;48(2):538-52.

7. Pardo A, Cabrera S, Maldonado M, Selman M. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2016;17:23. doi: 10.1186/s12931-016-0343-6.
8. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:786-801.
9. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. Epilysin, a Novel Human Matrix Metalloproteinase (MMP-28) expressed in Testis and Keratinocytes and in Response to Injury. *J Biol Chem.* 2001;276(13): 10134–10144.
10. Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 2001;265:87-93.
11. Werner SR, Mescher AL, Neff AW, King MW, Chaturvedi S, Duffin KL, Harty MW, Smith RC. Neural MMP-28 Expression Precedes Myelination During Development and Peripheral Nerve Repair. *Developmental Dynamics* 2007;236:2852–2864.
12. Momohara S, Okamoto H, Komiya K, Ikari K. Matrix metalloproteinase 28/epilysin expression in cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: comment on the article by Kevorkian et al. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12): 4074–5; author reply 4075.
13. Jian P, Yanfang T, Zhuan Z, Jian W, Xueming Z, Jian N. MMP28 (epilysin) as a novel promoter of invasion and metastasis in gastric cancer. *BMC Cancer.* 2011;11:200.
14. Manicone AM, Birkland TP, Lin M, Betsuyaku T, van Rooijen N, Lohi J, Keski-Oja J, Wang Y, Skerrett SJ, Parks WC. Epilysin (mmp-28) restrains early macrophage recruitment in pseudomonas aeruginosa pneumonia. *J Immunol.* 2009;182:3866-3876.

15. Manicone AM, Harju-Baker S, Johnston LK, Chen AJ, Parks WC. Epilysin (matrix metalloproteinase-28) contributes to airway epithelial cell survival. *Respir Res.* 2011;12:144.
16. Gharib SA, Johnston LK, Huizar I, Birkland TP, Hanson J, Wang Y, Parks WC, Manicone AM. MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol.* 2014;95:9-18.
17. Manicone AM, Gharib SA, Gong KQ, Eddy WE, Long ME, Frevert CW, Altemeier WA, Parks WC, Houghton AM. Matrix Metalloproteinase-28 Is a Key Contributor to Emphysema Pathogenesis. *Am J Pathol.* 2017;187(6):1288-1300.
18. Staab-Weijnitz CA, Fernandez IE, Knüppel L, Maul J, Heinzelmann K, Juan-Guardela BM, Hennen E, Preissler G, Winter H, Neurohr C, Hatz R, Lindner M, Behr J, Kaminski N, Eickelberg O. FK506-Binding Protein 10, a Potential Novel Drug Target for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192(4):455-467.
19. Königshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Günther A, Eickelberg O. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2009;119(4):772-87.
20. Herrera I, Cisneros J, Maldonado M, Ramírez R, Ortiz-Quintero B, Anso E, Chandel NS, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinase (MMP)-1 induces lung alveolar epithelial cell migration and proliferation, protects from apoptosis, and represses mitochondrial oxygen consumption. *J Biol Chem.* 2013;288:25964-25975.
21. Pardo A, Selman M, Kaminski N. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008;40:1141–1155.

22. Smirnova NF, Schamberger AC, Nayakanti S, Hatz R, Behr J, Eickelberg O. Detection and quantification of epithelial progenitor cell populations in human healthy and IPF lungs. *Respir Res.* 2016;17:83.
23. Xu Y, Mizuno T, Sridharan A, Du Y, Guo M, Tang J, Wikenheiser-Brokamp KA, Perl AT, Funari VA, Gokey JJ, Stripp BR, Whitsett JA. Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight.* 2016; 1(20): e90558.
24. Illman S, Lehti K, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J Cell Sci.* 2006;119:3856–3865.
25. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:6292–7.
26. Jara P, Calyeca J, Romero Y, Plácido L, Yu G, Kaminski N, Maldonado V, Cisneros J, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308:L511-22.
27. Pavlaki M, Zucker S, Dufour A, Calabrese N, Bahou W, Cao J. Furin Functions as a Nonproteolytic Chaperone for MatrixMetalloproteinase-28: MMP-28 Propeptide Sequence Requirement. *Biochem Res Int.* 2011. Article ID 630319.
28. Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, Khaw PT. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *Am J Pathol.* 2005;166:1555-63.

29. Ip YC, Cheung ST, Fan ST. Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*. 2007;46, 225–230.
30. Choi DH, Kim EM, Son HJ, Joh TH, Kim YS, Kim D, Flint Beal M, Hwang O. A novel intracellular role of matrix metalloproteinase-3 during apoptosis of dopaminergic cells. *J Neurochem*. 2008;106(1):405-15.
31. Lovett DH, Mahimkar R, Raffai RL, Cape L, Maklashina E, Cecchini G, Karlner JS. A Novel Intracellular Isoform of Matrix Metalloproteinase-2 Induced by Oxidative Stress Activates Innate Immunity. *PLoS ONE*. 2012. 7(4): e34177.
32. Xiangyang Zuo, Wen Pan, Tingting Feng, Xiaohong Shi, Jianfeng Dai. Matrix Metalloproteinase 3 Promotes Cellular AntiDengue Virus Response via Interaction with Transcription Factor NFkB in Cell Nucleus. *PLoS One*. 2014;9(1):e84748.
33. DeCoux A, Lindsey ML, Villareal F, Garcia RA, Schulz R. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;77:64-72.
34. Ceron CS, Baligand C, Joshi SK, Wanga S, Cowley PM, Walker JP, Song SH, Mahimkar R, Baker AJ, Raffai RL, Wang ZJ, Lovett DH. An intracellular matrix metalloproteinase-2 isoform induces tubular regulated necrosis: implications for acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;;312(6):F1166-F1183.
35. Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol*. 2008;28:2391–2413.
36. Marchant DJ, Bellac CL, Moraes TJ, Wadsworth SJ, Dufour A, Butler GS, Bilawchuk LM, Hendry RG, Robertson AG, Cheung CT, Ng J, Ang L, Luo Z, Heilbron K, Norris MJ, Duan W, Bucyk T, Karpov A, Devel L, Georgiadis D, Hegele RG, Luo H, Granville DJ,

Dive V, McManus BM, Overall CM. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nature Med.* 2014;20:493-502.

37. Shimizu-Hirota R, Xiong W, Baxter BT, Kunkel SL, Maillard I, Chen XW, Sabeh F, Liu R, Li XY, Weiss SJ. MT1-MMP regulates the PI3K δ •Mi-2/NuRD-dependent control of macrophage immune function. *Genes Dev.* 2012;26:395-413.

38. Eguchi T, Calderwood SK, Takigawa M, Kubota S, Kozaki KI. Intracellular MMP3 Promotes *HSP* Gene Expression in Collaboration With Chromobox Proteins. *J Cell Biochem.* 2017;118(1):43-51.

39. Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims DE, Sawicki G, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *The FASEB Journal.* 2004;1, 690-692.

40. Si-Tayeb K, Monvoisin A, Mazzocco C, Lepreux S, Decossas M, Cubel G, Taras D, Blanc JF, Robinson DR, Rosenbaum J. Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol.* 2006;169(4):1390-1401.

41. Yang Y, Candelario-Jalil E, Thompson JF, Cuadrado E, Estrada EY, Rosell A, Montaner J, Rosenberg GA. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2010;112,134-149.

Figure Legends

Figure 1: *MMP28 is increased in IPF.* A. The expression of the MMP28 protein was analyzed by Western blot in 7 IPF and 6 control lungs from German (left) or Mexican (right) patients. B. Densitometric analysis represent 58, 48 and 46 kDa bands; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Figure 2: *MMP28 is expressed by alveolar and airway epithelial cells in IPF.* Left panel: Immunohistochemical localization of MMP28 in control lungs (A, C, E) and in IPF (B, D, F). Right panel: MMP28 localization by immunofluorescence in control (I, K, M, O) and IPF lungs (J, L, N, P). For confocal microscopy, keratin 5 (krt5) was used as a marker of epithelial cells, CC10 as a marker of Club cells and DAPI for nuclei. IHC negative controls were incubated with no primary antibody (G, H). Rabbit IgG was used as negative control in IF (Q, R). S represents cells coexpressing prosurfactant protein C (pro SP-C) and MMP28 in merged with transmitted light differential interference contrast (DIC). IHC: IPF n=8, Ctrl n=5. IF: IPF n=5, Ctrl n=3.

Figure 3. *MMP28 localization by immunofluorescence in epithelial cells in vitro.* Native human alveolar epithelial cells (A549; A, B, C representing five independent experiments by triplicate), primary human AEC (D, two independent experiments), and primary human airway epithelial cells differentiated *in vitro*, (E, F, two independent experiments by duplicate). Cytoplasmic localization is indicated with white arrows, and nuclear localization with yellow arrows. XZ and YZ images from Z-stacks of AEC validate the nuclear localization of MMP28 (C). MMP28 colocalizes with ERp57 (F). G: Western blot of nuclear (N) and cytoplasmic (C) fractions from A549 cells. β -tubulin and lamin A/C were used as markers of cytoplasmic and nuclear fractions respectively. These are the results of two independent experiments by duplicate.

Figure 4. *MMP28 induces proliferation in vitro and colocalizes with a proliferation biomarker in IPF lungs. protects from apoptosis and enhances epithelial to mesenchymal transition.* MMP28 transfected or silenced A549 alveolar epithelial cells were evaluated for growth rate (A) and proliferation (B). Panels A and B show one representative experiment of four independent experiments by triplicate (data are presented as mean \pm SD; *** p <0.001). Panel C show epithelial cells coexpressing anti-*phospho-Histone H3*, a proliferation marker and MMP28. $n=2$.

Figure 5. *MMP28 protects from apoptosis, promotes migration and enhances epithelial to mesenchymal transition of A549 epithelial cells.*

Panel A illustrates the % of apoptosis induced by bleomycin. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments (* p <0.05, ** p <0.01). Panel B: Scratch assays with MMP28 transfected or silenced A549 cells. The magnification is 10x. The figure shows one representative experiment from four experiments performed by quadruplicate. Panel C: Transmigration over collagen I in Boyden chambers. One representative experiment of two independent experiments by triplicate. Panels D and E: Mock and MMP28 transfected cells were stimulated with TGF- β 1 for 2 days (D) and 4 days (E). E-cadherin was used as a marker of epithelial cells, and fibronectin as a marker of mesenchymal cells. Western blots are representative of three independent experiments.

Figure 6. *MMP28 effects on migration and proliferation are catalytic-dependent.*

Cells were transfected with WT MMP28 (MMP28) or catalytically inactive MMP28 (EA), and proliferation (A and B) and wound closure (C and D) were measured. Each graph is representative of three experiments by triplicate. Data are presented as mean \pm SD; * p <0.05, *** p <0.001).

Figure 7. *Analysis of Mmp28 in murine pulmonary fibrosis model.* WT mice after 14 days of saline or bleomycin instillation: Mmp28 IHC (A), Mmp28 western-blot (B). WT or Mmp28-deficient mice (KO) after 14 days of saline or bleomycin instillation: Masson's

trichrome (C), OH-Proline quantification (D), transmigration of lung epithelial enriched fraction over collagen I in Boyden chambers (E). Two independent experiments with n=6.

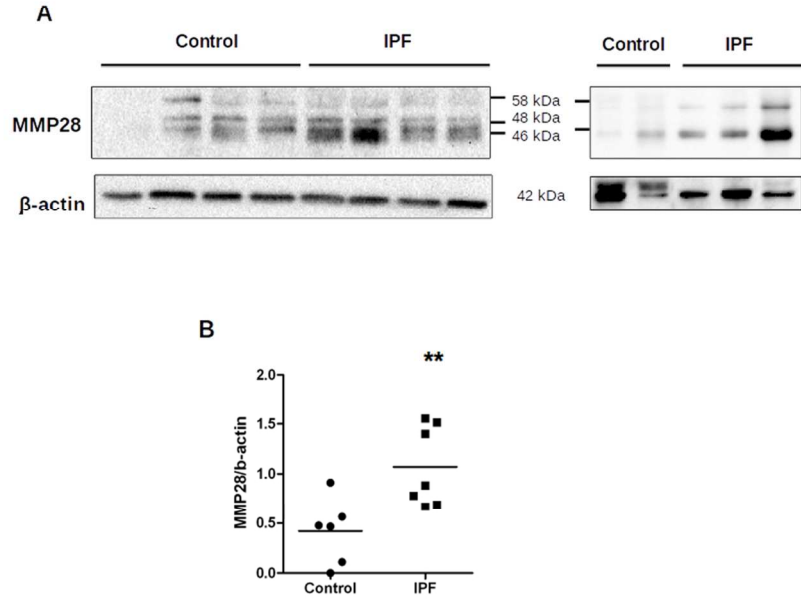


Figure 1

Figure 1. MMP28 is increased in IPF. A. The expression of the MMP28 protein was analyzed by Western blot in 7 IPF and 6 control lungs from German (left) or Mexican (right) patients. B. Densitometric analysis represent 58, 48 and 46 kDa bands; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

55x44mm (600 x 600 DPI)

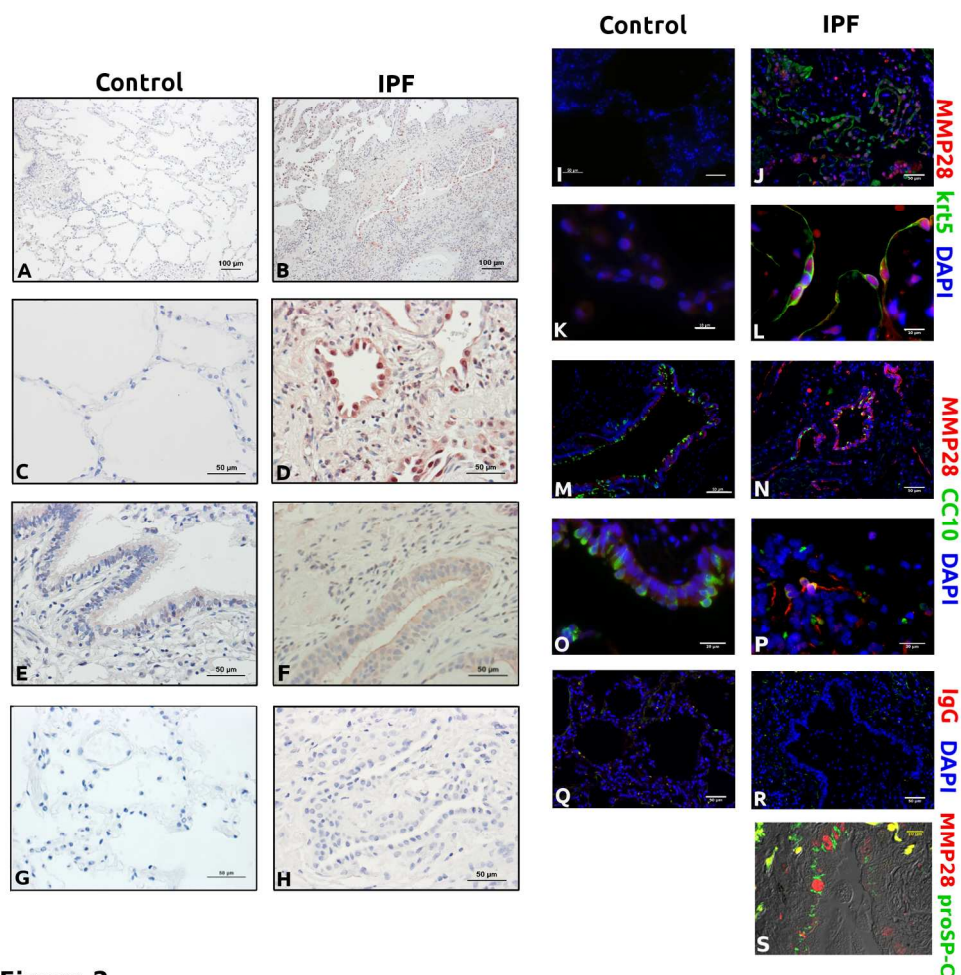


Figure 2

Figure 2. MMP28 is expressed by alveolar and airway epithelial cells in IPF. Left panel: Immunohistochemical localization of MMP28 in control lungs (A, C, E) and in IPF (B, D, F). Right panel: MMP28 localization by immunofluorescence in control (I, K, M, O) and IPF lungs (J, L, N, P). For confocal microscopy, keratin 5 (krt5) was used as a marker of epithelial cells, CC10 as a marker of Club cells and DAPI for nuclei. IHC negative controls were incubated with no primary antibody (G, H). Rabbit IgG was used as negative control in IF (Q, R). S represents cells coexpressing prosurfactant protein C (pro SP-C) and MMP28 in merged with transmitted light differential interference contrast (DIC). IHC: IPF n=8, Ctrl n=5. IF: IPF n=5, Ctrl n=3.

173x180mm (300 x 300 DPI)

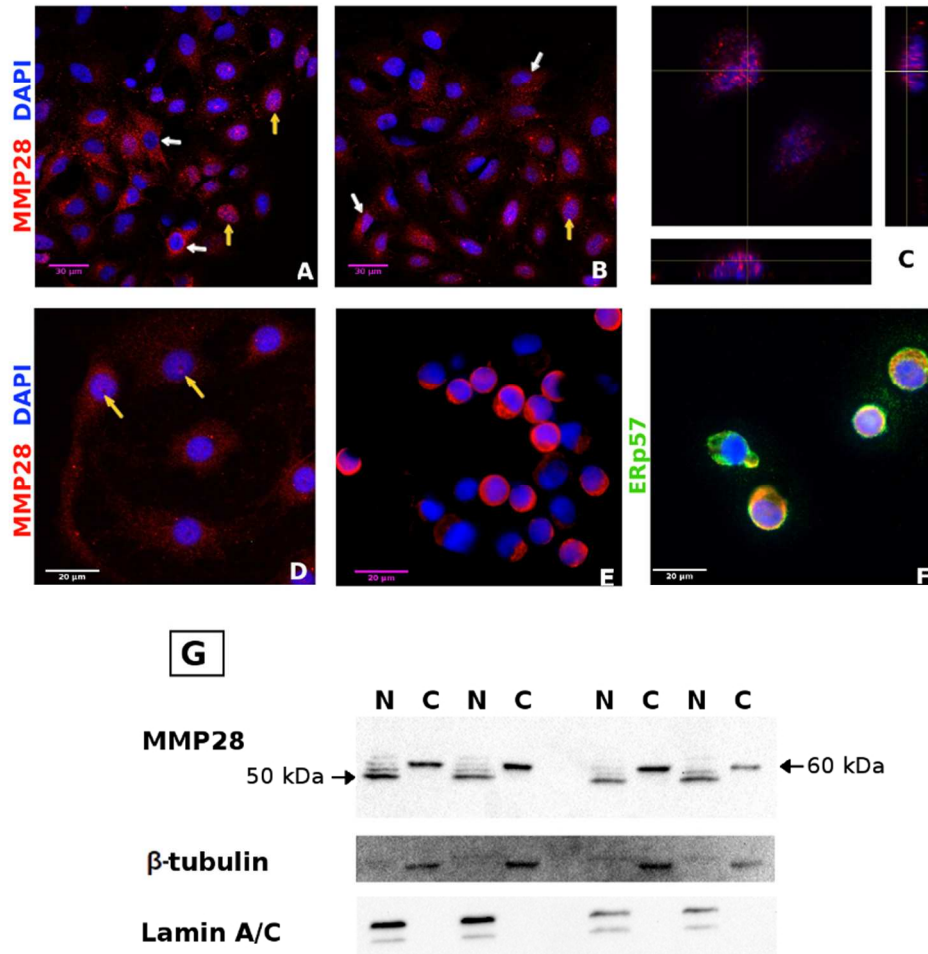


Figure 3

Figure 3. MMP28 localization by immunofluorescence in epithelial cells in vitro. Native human alveolar epithelial cells (A549; A, B, C representing five independent experiments by triplicate), primary human AEC (D, two independent experiments), and primary human airway epithelial cells differentiated in vitro, (E, F, two independent experiments by duplicate). Cytoplasmic localization is indicated with white arrows, and nuclear localization with yellow arrows. XZ and YZ images from Z-stacks of AEC validate the nuclear localization of MMP28 (C). MMP28 colocalizes with ERp57 (F). G: Western blot of nuclear (N) and cytoplasmic (C) fractions from A549 cells. β -tubulin and lamin A/C were used as markers of cytoplasmic and nuclear fractions respectively. These are the results of two independent experiments by duplicate.

80x80mm (300 x 300 DPI)

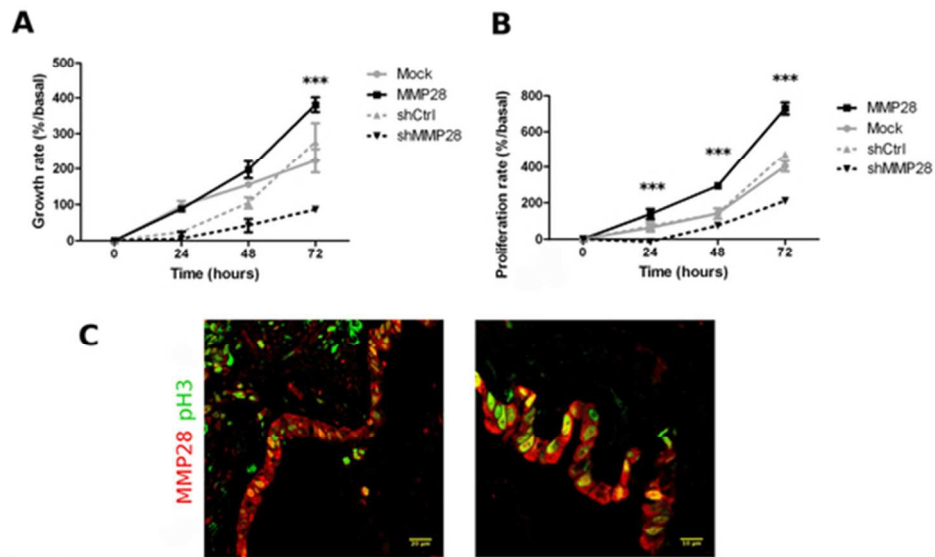


Figure 4

Figure 4. MMP28 induces proliferation in vitro and colocalizes with a proliferation biomarker in IPF lungs. protects from apoptosis and enhances epithelial to mesenchymal transition. MMP28 transfected or silenced A549 alveolar epithelial cells were evaluated for growth rate (A) and proliferation (B). Panels A and B show one representative experiment of four independent experiments by triplicate (data are presented as mean \pm SD; *** p <0.001). Panel C show epithelial cells coexpressing anti-phospho-Histone H3, a proliferation marker and MMP28. $n=2$.

51x33mm (300 x 300 DPI)

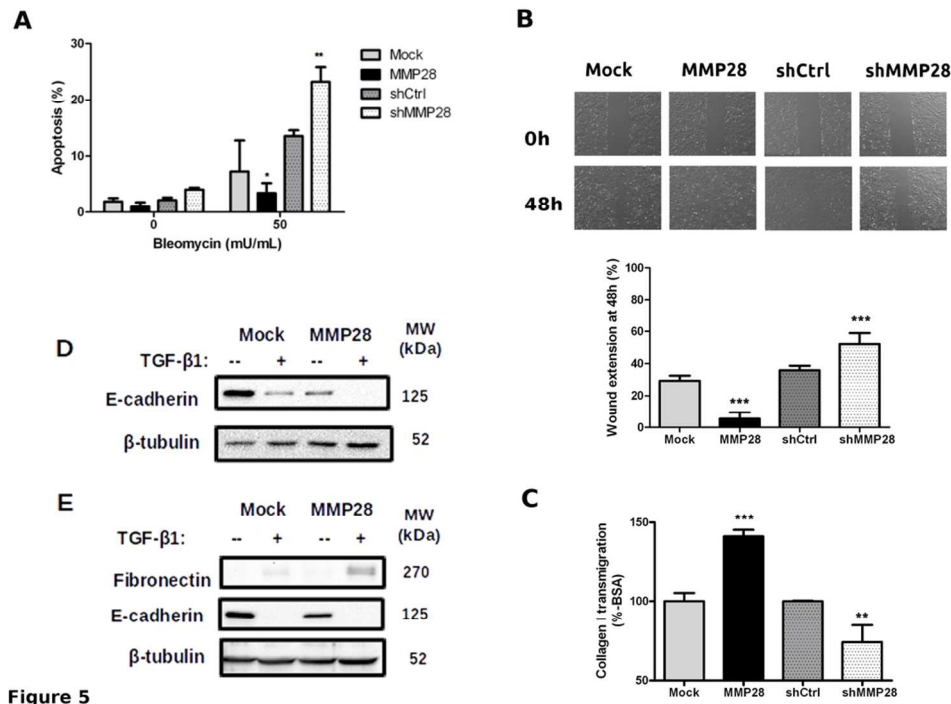


Figure 5

Figure 5. MMP28 protects from apoptosis, promotes migration and enhances epithelial to mesenchymal transition of A549 epithelial cells.

Panel A illustrates the % of apoptosis induced by bleomycin. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments (* p <0.05, ** p <0.01). Panel B: Scratch assays with MMP28 transfected or silenced A549 cells. The magnification is 10x. The figure shows one representative experiment from four experiments performed by quadruplicate. Panel C: Transmigration over collagen I in Boyden chambers. One representative experiment of two independent experiments by triplicate. Panels D and E: Mock and MMP28 transfected cells were stimulated with TGF- β 1 for 2 days (D) and 4 days (E). E-cadherin was used as a marker of epithelial cells, and fibronectin as a marker of mesenchymal cells. Western blots are representative of three independent experiments.

99x72mm (300 x 300 DPI)

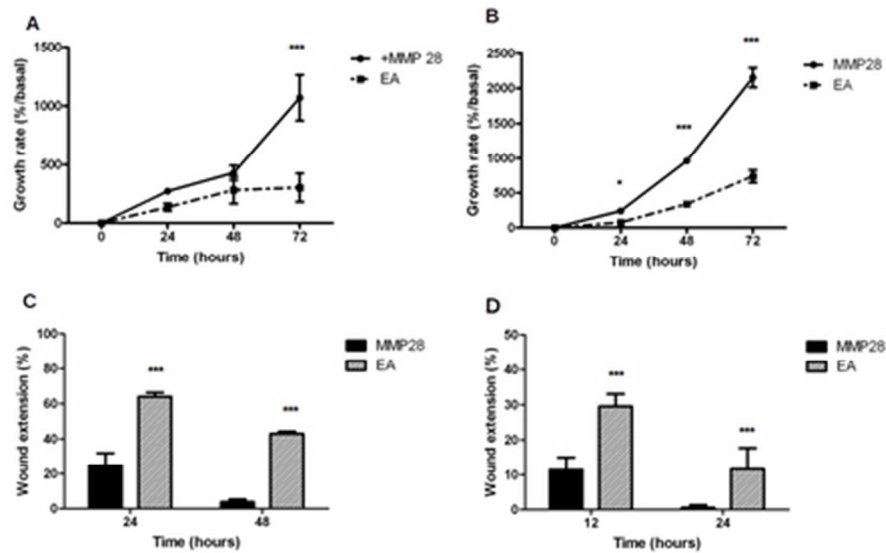


Figure 6

Figure 6. MMP28 effects on migration and proliferation are catalytic-dependent. Cells were transfected with WT MMP28 (MMP28) or catalytically inactive MMP28 (EA), and proliferation (A and B) and wound closure (C and D) were measured. Each graph is representative of three experiments by triplicate. Data are presented as mean \pm SD; * p <0.05, *** p <0.001).

19x15mm (600 x 600 DPI)

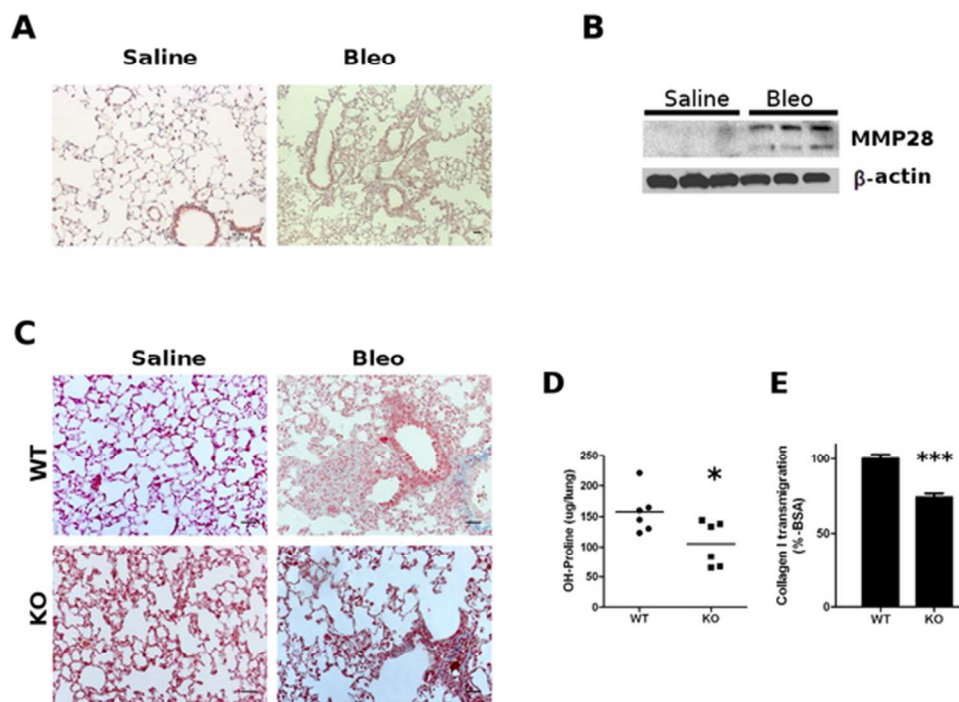


Figure 7

Figure 7. Analysis of Mmp28 in murine pulmonary fibrosis model. WT mice after 14 days of saline or bleomycin instillation: Mmp28 IHC (A), Mmp28 western-blot (B). WT or Mmp28-deficient mice (KO) after 14 days of saline or bleomycin instillation: Masson's trichrome (C), OH-Proline quantification (D), transmigration of lung epithelial enriched fraction over collagen I in Boyden chambers (E). Two independent experiments with n=6.

54x43mm (300 x 300 DPI)

Online Data Supplement

Supplementary Materials and Methods

Bacteria culture and cloning

Cloning experiments were performed with *Escherichia coli* strain XL10-Gold (Agilent). Bacteria cultures were maintained in LB (L1900, Sigma) and LB agar (L2025, Sigma) in an incubator at 37°C. Heat-shock competent bacteria were prepared with CaCl₂ 0.1M. Transformed cells were selected with 20µg/mL of kanamycin. Plasmid extraction was performed with the alkaline lysis method and purified with columns (QIAGEN Plasmid Maxi Kit). Plasmid length was measured by electrophoresis after linealization with Xho I (data not shown). MMP28-DDK and empty vector pCMV6-Entry C-terminal Myc and DDK Tagged plasmids were purchased from Origene (RC215325, PS100001). Site-directed mutagenesis (SDM) was performed with QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (cat.200522, Agilent). Mutagenesis results were corroborated by sequencing with human MMP28 primers and/or plasmid primers (**table E12**) at the Molecular Biology Unit in Instituto de Fisiologia Celular, UNAM.

Mammalian cell culture

A549 authenticity was tested by short tandem repeats genetic profile at Instituto Nacional de Medicina Genomica (INMEGEN, Mexico). A549 cells were grown in Ham's F12 (Gibco), with 10% of fetal bovine serum (Gibco). The same media was used for rat AEC supplemented with: 0.01 mg/ml bovine pituitary extract, 0.005 mg/ml insulin, 2.5 ng/ml insulin-like growth factor, 0.00125 mg/ml transferrin, and 2.5 ng/ml epithelial growth factor (EGF). BEC were grown in BEGM (Lonza) with the recommended complements: epinephrin, retinoic acid, bovine pituitary extract, EGF, insulin, hydrocortisone, gentamicin sulfate, amphotericin-B, transferrin and triiodothyronine. BEC were used in passage 4 in

all experiments. Differentiated BEC were obtained as explained before (E1), at day 28 the cells were harvested and fixed as citospins for immunofluorescence. Mock and MMP28 transfected cells were stimulated with 5ng/mL of TGF β 1 (Biolegend) in serum-free medium for 2 or 4 days.

Imaging

Immunohistochemistry. Lung tissue sections were deparaffinized, rehydrated, incubated for 30min in H₂O₂ (3%), followed by heat-induced antigen retrieval with citrate buffer (10mM, pH 6.0) heated in a microwave. Tissue was blocked with Universal Block Solution (BioGenex) for 10min and with sheep serum for 30min, then incubated with the primary antibody solution at 4°C overnight. Incubation with secondary biotinylated antibody was performed at room temperature (RT) for 20 min (BioGenex), followed by incubation with streptavidin-HRP (BioGenex) at RT for 20 min. Finally, signal was developed using 3-amino-9-ethyl-carbazole AEC (BioGenex) in acetate buffer containing 0.05% H₂O₂ as substrate. The sections were counterstained with hematoxylin and mounted with Cristal Mount (Biomedica). Slides were examined under a Nikon microscope with NIS-Elements AR software.

Immunofluorescence. Lung tissue sections were deparaffinized, rehydrated, followed by antigen retrieval with citrate buffer (10mM, pH 6.0) at 125°C 10" in a decloaking chamber, and then slides were blocked with BSA 4% in PBS 1h. Incubation with primary antibody was performed overnight 4°C, followed by incubation with secondary antibodies for 1h at RT. Cells were fixed with p-formaldehyde 4%, permeabilized with Triton x-100 0.1%, blocked with BSA 4% in PBS, incubated with primary antibody overnight at 4°C, followed by incubation with secondary antibody for 1h at RT, washed and stained with DAPI, mounted with Fluoro Care Anti-Fade Mountant Mounting medium (FP001 G5, G10, Biocare medical), or with Fluorescence Mounting Medium (Dako S30223). Slides were examined under an Axio Imager Microscope (Carl Zeiss) or under a confocal laser-scanning microscope (Olympus FluoView™ FV1000).

Imaging flow cytometry. A549 transfected cells (Mock, WT-MMP28 or KQ-MMP28) were harvested, counted, prepared as 20 million/mL, washed with PBS, fixed with FOXP3 Fix/Perm Buffer (421401, BioLegend) during 20 min at RT, washed and permeabilised with FOXP3 Perm buffer (421402, BioLegend) overnight at 4°C. Incubation with primary antibody was performed in FOXP3 Perm buffer 90 min at RT. Incubation with AF488 conjugated secondary antibody was performed in PBS with BSA 1% 1h at RT. Cells were washed twice and stained with 7-aminoactinomycin D (7AAD, 559925, Bio Legend). 5000 events defined as single cells were acquired at low speed and high sensitivity with the 60x magnification objective in an amnis ImageStream®X Mark II Imaging Flow Cytometer (Merck). Data were analyzed using the nuclear translocation tool of ImageStream Data Exploration and Analysis Software (IDEAS®, Merck).

Silencing and overexpression

AEC were seeded at 80% confluency; next day, lentiviral particles (Santa Cruz) with scrambled control shRNA (sc-108080) or shMMP28 (sc-62278-V) were added with 5µg/mL of polybrene (sc-134220, Santa Cruz) and incubated for 24h. Cells were washed, divided and selected with puromicine for stable transfection. For HBEC silencing, scrambled siRNA (AM4611, Ambion) or siMMP28 (s35627, Ambion) was added to cells with Lipofectamine RNAiMAX (13778-150, Invitrogen), at the time of seeding (reverse transfection). For overexpression, human or rat AEC were seeded at 80% confluency; next day, 1µg of plasmid (MMP28, KQ-MMP28, EA or Mock: RC215325 and pCMV6-Entry C-terminal Myc and DDK Tagged, PS100001 Origene) was added with Turbofectin (TF81001, Origene); after 48h, cells were washed, divided and selected with G418 for stable transfection.

Quantitative PCR. MMP28 expression was analyzed in silenced, transfected and stimulated cells by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Total RNA was isolated using Trizol Reagent (Life Technologies), then cDNA was synthesized with the Verso cDNA synthesis Kit (AB-1453/B, Thermo Scientific), and qPCR was performed with Master Mix

(Applied Biosystems) and Taqman probes: hMMP28 and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (Applied Biosystems) as endogenous.

Protein expression. Cells were lysed with RIPA buffer (PBS with IGEPAL 1%, Deoxycholate 0.5% and SDS 0.1%), or fractions were obtained as cytoplasmic and nuclear proteins with the NE-PER kit (78835, Thermo Scientific). Conditioned media were dialyzed with PMSF 0.1 M and NEM 2M (serine and cysteine protease inhibitors), lyophilized and resuspended in 1/100 the initial volume. Proteins were quantified with Bradford (BioRad) or with bicinchoninic acid (BCA) assay (Thermo). Samples for western blot were prepared with sample Laemmli buffer with 2-mercaptoethanol, and heated for 5min at 95°C. SDS-PAGE was followed by humid transfer to nitrocellulose or PVDF membranes, which were blocked 1h at RT with 5% fat-free milk in TBS with 0.05% tween-20 (TBS-T). After overnight incubation with primary antibody at 4°C, membranes were washed with TBS-T, followed by incubation with secondary antibody for 1h at RT, washed again and developed with enhanced chemiluminescence (ECL) system (Thermo Fisher Scientific), detected with ChemiDoc XRS imaging system (Bio-Rad) and analyzed with Image Lab 5.2.1 software (Bio-Rad), including densitometric analysis.

Functional Effects

Growth rate was studied with the WST-1 reagent (Roche). Cells were seeded on 96-well plates, with AEC being seeded at low confluence (~60%) and BEC at medium confluence (~80%). AEC assays were performed in the presence of 1% FBS. Cells were incubated at day zero, one, two and three with serum-free medium and WST-1 reagent for 1h at 37°C (for AEC 5uL of reagent was added to 100uL of medium; while BEC used 10uL of reagent in 100uL of medium). Optic density (OD) was measured at 450 nm and 620 nm as reference. Growth rate was calculated as percent over basal measure (day zero). Three independent experiments per cell type per triplicate were performed.

Proliferation rate was measured with CyQUANT reagent (Thermo Fischer Scientific). Cells were seeded on 96-well plates just as for the growth rate experiments. AEC assay was performed in presence of 1% FBS. Every 24h medium was removed, cells were washed with PBS and wells were frozen at -80°C. At the end, all wells were thawed to RT, and incubated with lysis buffer and CyQUANT GR. Fluorescence was read at 480nm and 520 nm as reference. Proliferation rate was calculated as percent over basal measure (day zero). At least two independent experiments per cell type per triplicate were performed.

Apoptosis. Cells were seeded at 75% confluence and stimulated with 50mU/mL of bleomycin (Bleolem) in serum-free medium for 48h. Cells were harvested and stained with PE Annexin V (556421 BD Biosciences) and 7-aminoactinomycin D (7AAD, 559925, Biolegend). Cells were analyzed by flow cytometry in a CANTO flow cytometer (BD Biosciences). Results were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc). Three independent experiments were performed per duplicate.

Wound assay was performed as follows. Cells were seeded at 100% confluence, AEC in six-well plates, rat AEC in 12-well plates, and BEC in 24-well plates. A *scratch* was drawn with a 200uL tip. Images were taken with an inverted EVOS XL microscope (Life Technologies) and analyzed with ImageJ software. Three independent experiments per quadruplicate were performed.

Transwell cell migration. Cells were seeded on Collagen I coated 8µm transwells (QCM Haptotaxis Cell Migration Assay – Collagen1, Colorimetric ECM582 Millipore). 50ng/mL of EGF was used as chemoattractant. After 18h, transwells were stained with crystal violet to measured migration. Cells on BSA-coated chambers were used as blanks for each sample. OD was read at 560 nm. These experiments were performed twice by triplicate.

Hydroxyproline quantification

Lungs were hydrolyzed in 1 ml of 6N HCl for 18h at 95°C. Aliquots were measured in a microplate with chloramine T and Ehrlich solution as explained elsewhere (E4). Absorbance was measured at 550 nm, data were expressed as micrograms of hydroxyproline per lung as determined by a standard curve.

In silico motives search. MMP28 sequence was evaluated by two different free software tools: *PredictProtein* (E2) and *NLStradamus* (E3), prediction cutoff 0.7.

Lung epithelial enriched cell fraction.

Lung epithelial enriched cell fraction. Mice lung epithelial cells were isolated by negative selection. Enzymatic digestion of the lungs was performed, cell suspension was incubated with erythrocyte lysis buffer, and negative selection was performed with CD45 beads. The filtered cell suspension had 85% purity of epithelial cells verified by flow cytometry.

Antibodies.

From abcam: ERp57 ab13506, cytokeratin 5 (CK5) ab52635, fibronectin [IST-2] ab6435. From Sigma-Aldrich β -actin (ACTB) HRP-conjugated anti-ACTB. From Cell signaling lamin A/C (2032). From Biogenex E-cadherin AM390-10M. From Biolegend β -actin 622101. From Santa Cruz: pan-cytokeratin sc8018, proSPC sc-293169 and Mmp28 sc-367259 (figure E6). From EMD Millipore 05-806 Anti-phospho-Histone H3 (Ser10) Antibody, clone 3H10. From Life Technologies fluorescent secondary antibodies and reagents: goat anti-rabbit AF568 A11011; donkey anti-mouse AF488 A11001; DAPI: NucBlue R37606. From Novus Biologicals: MMP28 NBP2-17314 (figure 2, 3A-C). From Origene: DDK, TA50011-100 and TA180144. From Amersham: anti-mouse and anti-rabbit. From Triple Point Biologics: RP2-MMP28 (figure 2, E1), RP3-MMP28 (figure 2, E2), RP4-MMP28 (figures 2, 3E-G, 4, E1, E2), SPA-MMP28 (figure 1, 2, 3A-D, E2). RP2-MMP28 binds to the prohormone convertase

region (beginning of the catalytic domain), RP3-MMP28 binds to the hinge domain, RP4-MMP28 binds to the hemopexin-like domain; SPA-MMP28 is a pool that contains RP2, RP3 and RP4-MMP28.

Table E1.

Demographic characteristics of the patients included in the study

Patients	Mexico	Germany
n	17	9
Gender (M:F)	14:3	7:2
Age (years)	61.7 ± 7.5	56.1 ± 8.6

Table E2.

Oligonucleotides used for plasmid sequencing and site-directed mutagenesis (SDM).

Primer	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
MMP28	CAGCTGGGACGACGTGCTGG	GCGTTTCAGGGCGCCTTCCT
Plasmid	GGACTTTCCAAAATGTCG	ATTAGGACAAGGCTGGTGGG
EA SDM	GCTGGCGCACGCGATCGGTCACACG CTTGCC	GGCCAAGCGTGTGACCGATCGCGTGC GCC AGC
KQ SDM	GACACCGGACCCAAATGAGGCGTCA GCAACGCTTTGC	GCAAAGCGTTGCTGACGCCTCATTTGGGTC CGGTGTC

Supplementary references

(E1) Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N, Eickelberg O. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Sci Rep*. 2015;5:8163.

(E2) Rost B., Yachdav G., Liu J. ThePredictProtein Server. *Nucleic Acids Research* 2004;32(Web Server issue):W321-W326 <http://www.predictprotein.org>

(E3) Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(1):202 <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>

(E4) Cabrera S, Maciel M, Herrera I, Nava T, Vergara F, Gaxiola M, López-Otín C, Selman M, Pardo A. Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autophagy*. 2015; 11(4):670-84.

Supplementary Figures Legends

Figure E1. Confocal images revealed nuclear staining of MMP28 in alveolar epithelial cells. Z-stacking in IPF tissue with apparent nuclear MMP28 was analyzed. Orthogonal views at three different cells in this area shows that the signal in some cells was inside the nucleus (A, B), and in others was perinuclear (C). Panels D and E show pancytokeratin and keratin 5 (krt5) expression in A549 cells. Panel F: negative control. N=2.

Figure E2. Mutation of lysines in probable NLS does not affect nuclear localization of MMP28. Pannel A: Graphics show the percentage of cells with colocalization of MMP28 or tag and DNA. The figure represents the mean of two independent experiments \pm SEM where 5000 events defined as single cells were acquired at low speed and high sensitivity with the 60x magnification objective. **B:** Representative images of cells obtained by confocal flow cytometry (via ImageStream, see supplementary methods) showing localization of transfected DDK-tagged wildtype MMP28 (WT-MMP28) or mutant MMP28 (KQ-MMP28). Transfected proteins were detected with anti-DDK (tag) antibody (green). DNA was stained with 7AAD (red).

Figure E3. Overexpression and silencing of MMP28 in vitro. A and B: qPCR and Western blot of A549 transfected cells. C and D: qPCR and Western blot of A549 silenced cells. E and F: qPCR and Western blot of rat AEC transfected with human MMP28. G and H: Transient silencing of bronchial epithelial cells with scrambled (scr) or siMMP28 (si28). DDK: tag marker. CM: conditioned media.

Figure E4. MMP28 increases growth rate of rat alveolar epithelial cells and human bronchial epithelial cells. (A, B): Growth and proliferation rates of rat AEC transfected with human MMP28. (C, D): Growth and proliferation rates of MMP28 silenced BEC. Each

graph is representative of at least two experiments by triplicate. Data are expressed as mean \pm SD, (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure E5. *MMP28 promotes wound closure of rat alveolar epithelial cells and human bronchial epithelial cells.* Scratch assays with transfected rat AEC (A) and silenced BEC (B). Graphs are representative of three experiments by quadruplicate. Data are presented as mean \pm SD (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

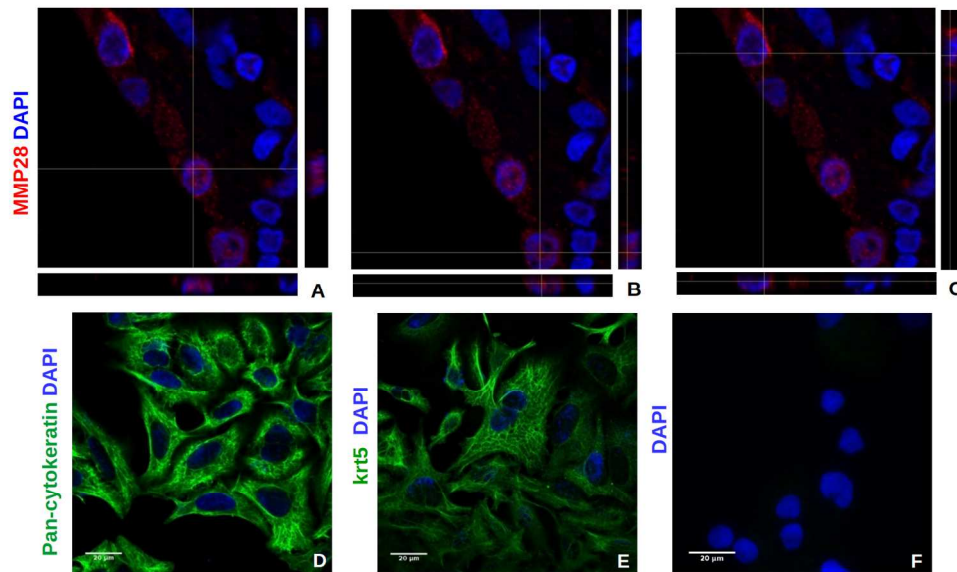


Figure E1

Figure E1. Confocal images revealed nuclear staining of MMP28 in alveolar epithelial cells. Z-stacking in IPF tissue with apparent nuclear MMP28 was analyzed. Orthogonal views at three different cells in this area shows that the signal in some cells was inside the nucleus (A, B), and in others was perinuclear (C). Panels D and E show pancytokeratin and keratin 5 (krt5) expression in A549 cells. Panel F: negative control. N=2.

155x109mm (300 x 300 DPI)

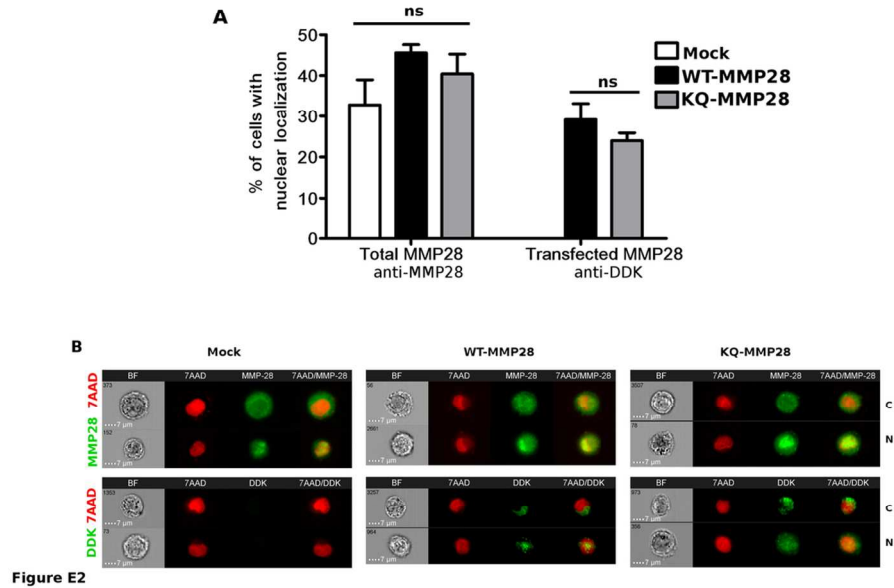


Figure E2. Mutation of lysines in probable NLS does not affect nuclear localization of MMP28. Pannel A: Graphics show the percentage of cells with colocalization of MMP28 or tag and DNA. The figure represents the mean of two independent experiments \pm SEM where 5000 events defined as single cells were acquired at low speed and high sensitivity with the 60x magnification objective. B: Representative images of cells obtained by confocal flow cytometry (via ImageStream, see supplementary methods) showing localization of transfected DDK-tagged wildtype MMP28 (WT-MMP28) or mutant MMP28 (KQ-MMP28). Transfected proteins were detected with anti-DDK (tag) antibody (green). DNA was stained with 7AAD (red).

109x75mm (300 x 300 DPI)

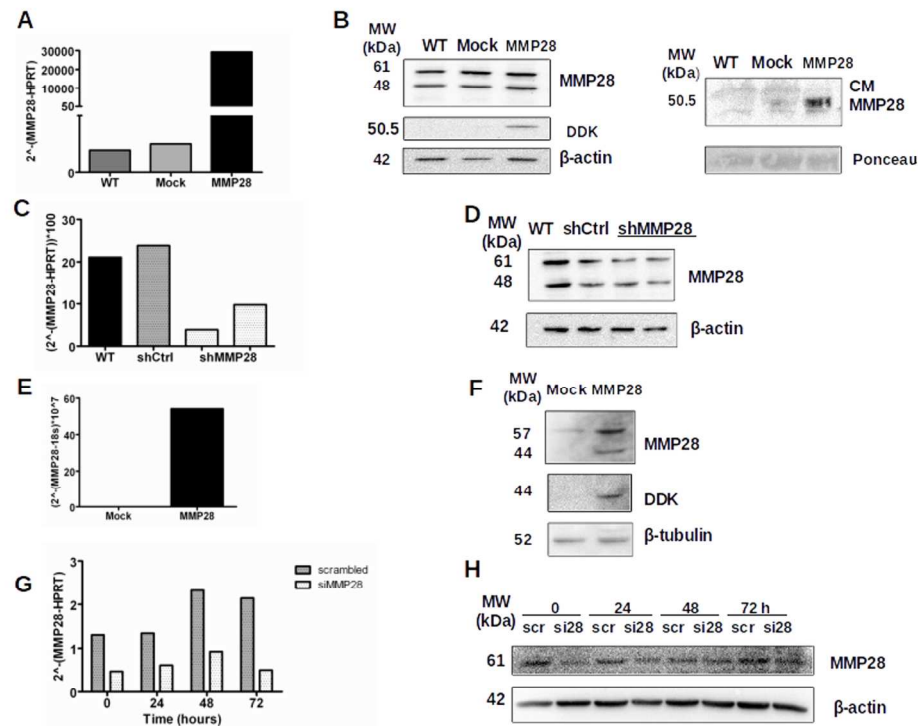


Figure E3

Figure E3. Overexpression and silencing of MMP28 in vitro. A and B: qPCR and Western blot of A549 transfected cells. C and D: qPCR and Western blot of A549 silenced cells. E and F: qPCR and Western blot of rat AEC transfected with human MMP28. G and H: Transient silencing of bronchial epithelial cells with scrambled (scr) or siMMP28 (si28). DDK: tag marker. CM: conditioned media.

80x80mm (600 x 600 DPI)

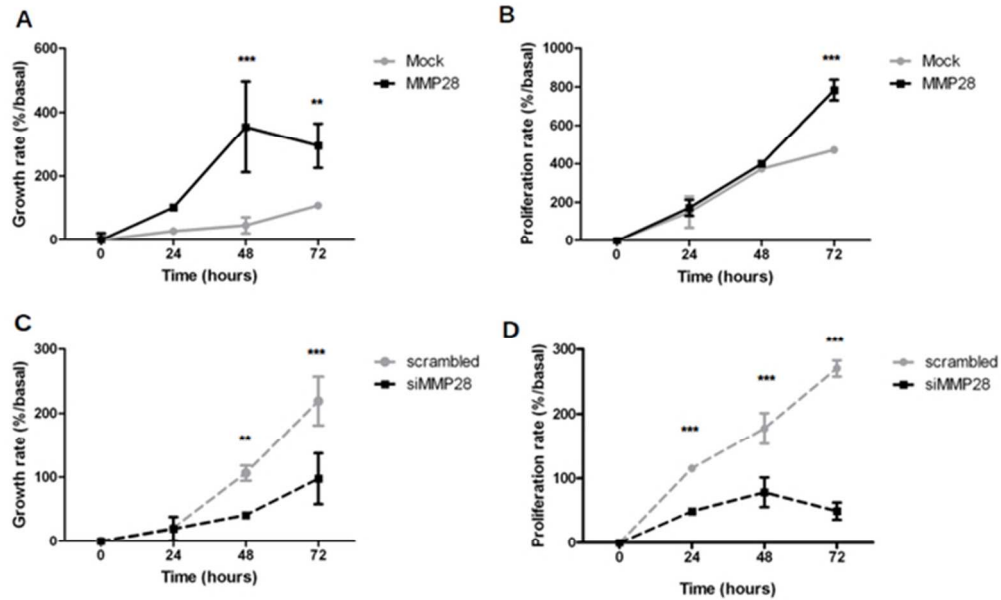


Figure E4

Figure E4. MMP28 increases growth rate of rat alveolar epithelial cells and human bronchial epithelial cells. (A, B): Growth and proliferation rates of rat AEC transfected with human MMP28. (C, D): Growth and proliferation rates of MMP28 silenced BEC. Each graph is representative of at least two experiments by triplicate. Data are expressed as mean \pm SD, (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

28x19mm (600 x 600 DPI)

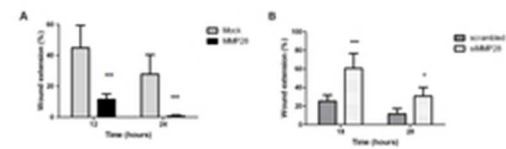


Figure E5

Figure E5. MMP28 promotes wound closure of rat alveolar epithelial cells and human bronchial epithelial cells. Scratch assays with transfected rat AEC (A) and silenced BEC (B). Graphs are representative of three experiments by quadruplicate. Data are presented as mean \pm SD (* p <0.05, *** p <0.001).

11x4mm (600 x 600 DPI)