



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE TMPRSS4 EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

**TESIS**

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

PRESENTA:

**M. EN C. VALERO JIMÉNEZ ANA MAYELA**

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. JOAQUÍN ALEJANDRO ZÚÑIGA RAMOS**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CD. MX.,

JULIO, 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.

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 30 de abril de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **VALERO JIMÉNEZ ANA MAYELA** con número de cuenta **300024577**, con la tesis titulada **"EFECTO DE TMPRSS4 EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA"**, realizada bajo la dirección del **M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA**:

Presidente: DRA. ANNIE PARDO CEMO  
Vocal: DRA. MARÍA EUGENIA CONSEBATT BONAPARTE  
Secretario: DR. JOAQUÍN ALEJANDRO ZÚÑIGA RAMOS  
Suplente: DRA. CRISelda MENDOZA MILLA  
Suplente: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 06 de junio de 2018

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACYT por el apoyo recibido a través:

- la beca de la convocatoria titulada “CONVOCATORIA DE BECAS NACIONALES 2011-2012 CUARTO PERIODO”.
- del financiamiento aprobado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social de CONACYT para el proyecto de investigación “Papel de la Serinproteasa Transmembranal 4 en el desarrollo, diagnóstico y seguimiento de la Fibrosis Pulmonar Idiopática” con número 234088.

Un agradecimiento especial a mi Tutor Principal el Dr. Moisés Eduardo Selman Lama y a los miembros de mi Comité Tutor el Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos y la Dra. Teresa Imelda Fortoul Van Der Goes por enriquecer este trabajo y mi formación con su conocimiento, apoyo y orientación.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) por facilitar las instalaciones necesarias para llevar a cabo este proyecto y por el apoyo recibido a través de la evaluación y aprobación del presente estudio por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER con el código B30-12.

Al Dr. Moisés Selman por la confianza que depositó en mí de principio a fin y por su claridad de mente que siempre me mostró el camino más cuerdo a seguir, con guía y libertad. Toda mi gratitud y admiración, ha sido un gusto coincidir y aprender de usted.

Al Dr. Joaquín Zúñiga por creer en mí, alentarme a siempre volar más alto y apoyarme para lograrlo.

Al Dr. Alberto Pizaña, por su amistad y su gran labor en el Bioterio del INER.

A mi querido Bichito, Cris, por nunca soltarme y siempre estar presta para ayudar y dispuesta a reír o llorar.

A Anita Vega e Ivette Buendía, por su complicidad, apoyo y apapachos que nos hicieron compartir grandes momentos.

A mi gran amigo... mi conciencia, Migue Ramírez, por conocer mis claroscuros, quererme y soportarme. Gracias por todo tu apoyo y cariño que han sido fundamentales para mí, sabes que tienes un lugar especial en mi helado corazón! jaja.

A Erika Rubí, mil gracias por el cariño incondicional de siempre, por tu apoyo en tiempos difíciles y tu opinión siempre sincera. Ha sido magnífico volver a estar juntas!

A mi querido Migue Negreros, por las largas jornadas compartidas en el lab y por iluminarme con tu brillante mente cada vez que lo necesité, por ser compañero de drama y carcajadas... pero sobre todo por siempre decirme lo que quiero escuchar! jajaja.

A todas las personas del Laboratorio de Biología Celular y del Laboratorio de Biología Molecular por su apoyo y disposición para el trabajo.

A mis padres y hermanos, por ser mi motor, el impulso y la fuerza constantes.

A mis grandes amigos, que sin estar involucrados de manera directa en mi desarrollo científico son parte fundamental en mi andar:

A mi alma gemela, Erandi, por compartir cerebro y corazón, porque seguimos aprendiendo y creciendo juntas.

A mi ángel guardián, Iván Sevilla, gracias por cuidar de mí y por tu preocupación siempre sincera; por regañarme cuando así lo he requerido y ayudarme a volar... simplemente no sé qué hubiera hecho sin ti!

A mi hermana, amiga y cómplice, May, por todas nuestras memorables aventuras, por los bailes felices y el abrazo en tiempos difíciles.

*A tí,  
que condensaste el tiempo y  
me regalaste momentos de infinitud.  
Y a tí,  
que siéndolo todo no pudiste ser.*

*“I have gotten a lot of results!  
I know several thousand things that won't work”*

*Thomas A. Edison*

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA .....	4
MECANISMOS PATOGENICOS .....	5
TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA Y FPI .....	6
REGULACIÓN PROTEOLÍTICA .....	9
CLASIFICACIÓN GENERAL DE LAS PROTEASAS .....	10
NIVELES DE COMPLEJIDAD .....	11
SERÍN-PROTEASAS TRANSMEMBRANALES .....	11
SERÍN-PROTEASAS TRANSMEMBRANALES TIPO II (TTSP) .....	12
<i>Características estructurales de las TTSPs</i> .....	14
<i>Distribución</i> .....	15
TMPRSS4.....	16
<i>Estructura</i> .....	16
<i>TMPRSS4 en condiciones fisiológicas</i> .....	17
<i>TMPRSS4 en condiciones patológicas</i> .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
GENERAL.....	22
PARTICULARES.....	22
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>23</b>
RT-PCR Y PCR CUANTITATIVA .....	23
CULTIVO CELULAR.....	24
ELISA .....	24
TASA DE CRECIMIENTO (A549 Y FIBROBLASTOS) .....	25
APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	26
ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR .....	27
INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC) .....	28
TINCIÓN CON VERDE METILO-PIRONINA Y AZUL DE TOLUIDINA .....	29
INMUNOFUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL .....	30
WESTERN BLOT.....	30
FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA CON BLEOMICINA .....	31
<i>Animales</i> .....	31
<i>Tipificación</i> .....	32
<i>Anestesia</i> .....	33
<i>Modelo animal</i> .....	33
<i>Ensayo de hidroxiprolina</i> .....	34
APROBACIÓN ÉTICA DEL PROTOCOLO Y CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN .....	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	35

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
Tmprss4 ESTÁ SOBRE-EXPRESADA EN PULMONES CON FPI .....	35
Tmprss4 SE EXPRESA PRINCIPALMENTE EN CÉLULAS EPITELIALES Y CEBADAS .....	37
Tmprss4 SE EXPRESA EN CÉLULAS EPITELIALES ALVEOLARES Y BRONQUIALES <i>IN VITRO</i> PERO NO EN FIBROBLASTOS. ....	41
Tmprss4 PROMUEVE AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE E-CADERINA EN CÉLULAS EPITELIALES. ....	43
Tmprss4 REDUCE LA TASA DE CRECIMIENTO EN CÉLULAS EPITELIALES ALVEOLARES Y NO INDUCE APOPTOSIS .....	46
Tmprss4 NO MODIFICA LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES ALVEOLARES.....	48
LA DEFICIENCIA DE Tmprss4 ATENÚA LA FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA CON BLEOMICINA EN RATÓN.....	50
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>63</b>
<b>ARTÍCULO DE REQUISITO .....</b>	<b>70</b>

## RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar crónica y progresiva que se caracteriza por la activación de las células del epitelio alveolar, la expansión de la población de fibroblastos y la acumulación excesiva de matriz extracelular. Los mecanismos que conducen a su desarrollo no se conocen con precisión pero existe evidencia que sugiere que la desregulación de múltiples proteasas contribuye a su patogénesis. La serin-proteasa transmembranal 4 (TMPRSS4) es una nueva serin-proteasa transmembranal tipo II que parece promover la migración celular y la transición epitelio mesénquima (TEM), dos procesos críticos en la patogénesis de la FPI. Así, la hipótesis de este trabajo es que la sobreexpresión de TMPRSS4 en el pulmón podría promover la iniciación o progresión de la FPI. Para comprobarlo, primero se evaluó la expresión y la localización de TMPRSS4 en pulmones provenientes de pacientes con FPI mediante PCR en tiempo real, western blot e inmunohistoquímica. Después, se analizó la respuesta fibrótica del pulmón en ratones de la cepa C57-BL/6 deficientes de TMPRSS4 comparados con animales silvestres (WT) usando el modelo de inducción de fibrosis pulmonar (FP) con bleomicina. Los resultados obtenidos muestran que TMPRSS4 está sobreexpresada en pulmones humanos con FPI, donde se encuentra principalmente en células epiteliales y células cebadas y virtualmente ausente en fibroblastos. Acorde con los resultados *in vivo*, TMPRSS4 fue expresada por células epiteliales alveolares y bronquiales *in vitro* mientras que no se observó expresión de la proteasa en fibroblastos pulmonares humanos normales o de pacientes con FPI. Inesperadamente, la proteína recombinante de TMPRSS4 provocó un incremento en los niveles de E-caderina en células epiteliales alveolares (línea A549). La respuesta fibrótica, evaluada en ratones silvestres y deficientes de TMPRSS4 28 días después de la instilación intratraqueal de bleomicina, estuvo marcadamente atenuada tanto en ratones haplodeficientes (HT) como deficientes (KO) de TMPRSS4. En este contexto, el análisis morfológico mostró una disminución significativa del índice fibrótico en los pulmones de los ratones HT y KO que fue corroborado mediante la cuantificación del contenido de colágena (hidroxiprolina: WT:  $164 \pm 21.1$   $\mu\text{g/pulmón}$  versus HT:  $110.2 \pm 14.3$   $\mu\text{g/pulmón}$  y KO:  $114.1 \pm 24.2$   $\mu\text{g/pulmón}$  ( $p < 0.01$ ). Al igual que en los pulmones de pacientes con FPI, TMPRSS4 se expresó

principalmente en células epiteliales y cebadas. Nuestros hallazgos indican que TMPRSS4 está sobreexpresada en pulmones con FPI y que podría desempeñar un papel profibrótico.

**Palabras clave:** fibrosis pulmonar, serin-proteasas, células epiteliales, células cebadas.

## ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and progressive lung disease characterized by epithelial cell activation, expansion of the fibroblast population and excessive extracellular matrix accumulation. The mechanisms are incompletely understood but evidence indicates that the deregulation of several proteases contributes to its pathogenesis. Transmembrane protease serine 4 (TMPRSS4) is a novel type II transmembrane serine protease that may promote migration and facilitate epithelial to mesenchymal transition (EMT), two critical processes in the pathogenesis of IPF. Thus, we hypothesized that over-expression of TMPRSS4 in the lung could promote the initiation and/or progression of IPF. In this study, we first evaluated the expression and localization of TMPRSS4 in IPF lungs by real time PCR, western blot, and immunohistochemistry. Then we examined the lung fibrotic response in wild type and TMPRSS4 deficient mice using the bleomycin-induced lung injury model. We found that this protease is upregulated in IPF lungs, where was primarily expressed by epithelial and mast cells and virtually absent in fibroblasts. Paralleling the findings *in vivo*, TMPRSS4 was expressed by alveolar and bronchial epithelial cells *in vitro* while no expression was observed in normal human or IPF lung fibroblasts. Unexpectedly, TMPRSS4 recombinant protein provoked an increase of E-cadherin levels in alveolar cells from the A459 cell line. The lung fibrotic response evaluated at 28 days after bleomycin injury was markedly attenuated in the haploinsufficient and deficient TMPRSS4 mice. By morphology, a significant reduction of the fibrotic index was observed in KO and heterozygous mice which was confirmed by measurement of collagen content (hydroxyproline: WT: 164±21.1 µg/lung versus TMPRSS4 haploinsufficient: 110.2±14.3 µg/lung and TMPRSS4 deficient mice: 114.1±24.2 µg/lung ( $p<0.01$ ). As in IPF, TMPRSS4 was also mainly expressed in epithelial and mast cells. These findings indicate that TMPRSS4 is upregulated in IPF lungs and that may have a profibrotic role.

**Keywords:** lung fibrosis, serine proteases, epithelial cells, mast cells.

## INTRODUCCIÓN

### Fibrosis pulmonar Idiopática

Las neumopatías intersticiales difusas (NID), también conocidas como enfermedades fibrosantes del pulmón, engloban a diferentes padecimientos respiratorios subagudos y crónicos que en general se caracterizan por el desarrollo de un proceso inflamatorio intersticial e intra-alveolar difuso, que de no resolverse, progresa hacia la fibrosis con destrucción de las unidades alveolo-capilares [1]. El daño en los tejidos puede resultar de diversos estímulos: infecciones, reacciones autoinmunes, toxinas, radiación y daño mecánico [2]. Sin embargo, un grupo de NID son de etiología desconocida y se denominan NID idiopáticas. Aunque los cambios fibróticos típicamente son conceptualizados como el depósito exagerado de moléculas de matriz en el intersticio (el espacio tisular que se encuentra entre las paredes alveolares), una parte importante de la remodelación del pulmón ocurre en los espacios alveolares. Dichos cambios pueden tener efectos dramáticos e irreversibles en la arquitectura pulmonar, resultando en insuficiencia respiratoria progresiva y ocasionando la muerte del paciente en pocos años [3].

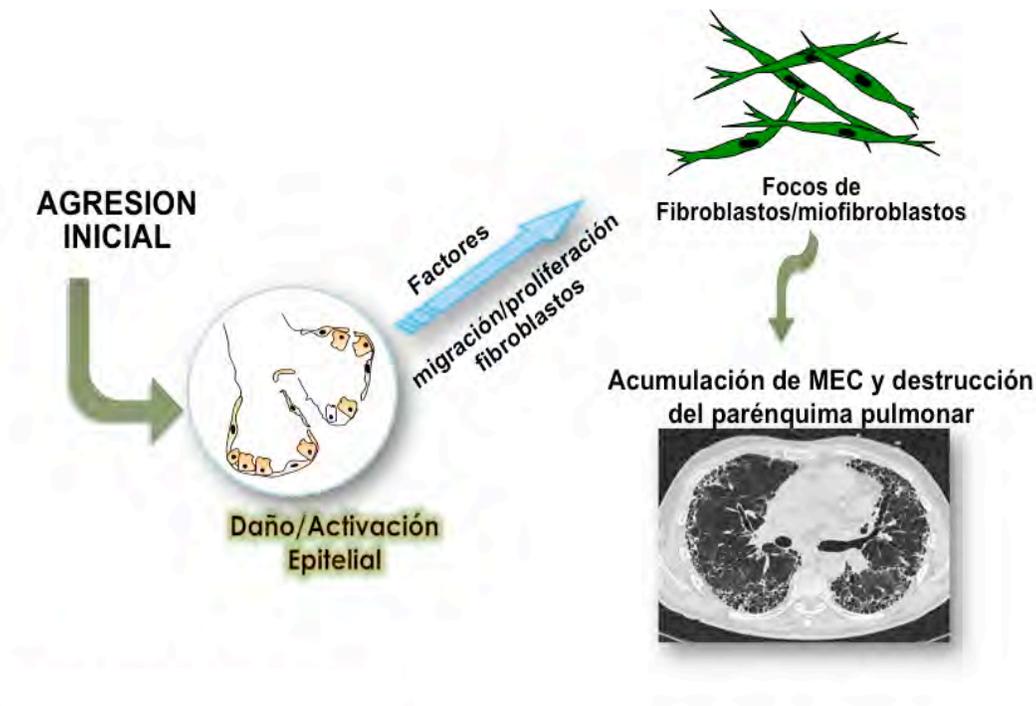
La fibrosis pulmonar idiopática es la más común de las NID idiopáticas y, de hecho, la más agresiva de todas ellas. Se trata de un padecimiento crónico, progresivo e irreversible, con una supervivencia promedio de 2-3 años luego de realizado el diagnóstico [4, 5]. El síntoma principal de la FPI es la disnea de esfuerzo progresiva y de evolución insidiosa, además se presenta tos seca o con expectoración mucosa, hiporexia, astenia y baja de peso, siendo la taquipnea un signo constante. La causa más común de muerte asociada con FPI es la progresión de la fibrosis pulmonar y de la insuficiencia respiratoria con el desarrollo consecuente de hipertensión arterial pulmonar y *cor pulmonale* [1].

A pesar de que la FPI es por definición una afección de etiología desconocida, se han descrito diversos factores potenciales de riesgo como: exposición al humo de tabaco, exposiciones ambientales a diferentes contaminantes, infecciones virales, exposiciones ocupacionales, diabetes, reflujo gastroesofágico y predisposición genética [6-8].

## Mecanismos patogénicos

Hasta ahora, se han propuesto dos rutas distintas para el desarrollo de la fibrosis pulmonar. Originalmente se postuló que la FPI (como las otras NID) era una fibrosis secundaria a inflamación crónica, es decir, un proceso ocasionado por una respuesta inflamatoria no resuelta [3, 9-11]. No obstante, diferentes estudios fueron revelando que esto no es así. Evidencia de ello es la presencia de escasa alveolitis tanto en estados tempranos o avanzados de la enfermedad y la falta de respuesta a terapia anti-inflamatoria potente y de largo plazo [3]. Así, se estableció la hipótesis epitelial en la que se propone que la FPI, a diferencia del resto de las NID, se caracteriza por la lesión y la activación anormal de las células del epitelio alveolar, mismas que provocan la migración y proliferación de fibroblastos y su diferenciación posterior a miofibroblastos, los cuales son responsables de la acumulación exagerada de matriz extracelular (MEC) y la consecuente destrucción de la arquitectura pulmonar [9, 12] (**Figura 1**).

En la FPI, las células del epitelio alveolar contribuyen a la fibrogénesis no sólo por secretar una serie de mediadores profibróticos, sino porque quizás son incapaces de producir algunos inhibidores de la proliferación de fibroblastos, los cuales adquieren un fenotipo migratorio, proliferativo y profibrótico (miofibroblasto) [3]. Las células epiteliales alveolares (CEAs) también pueden contribuir a la expansión de la población de fibroblastos/miofibroblastos en el pulmón, secretando factores quimiotácticos para fibrocitos circulantes y a través de la transición epitelio mesénquima (TEM) [13]. Y, aunque la participación de este último mecanismo en la FPI se encuentra en debate, la plasticidad epitelial con una reprogramación TEM parcial podría ser central en la organización de la reparación de heridas que, bajo estrés crónico y sin resolver, podría corromperse y favorecer una respuesta fibrótica [13].



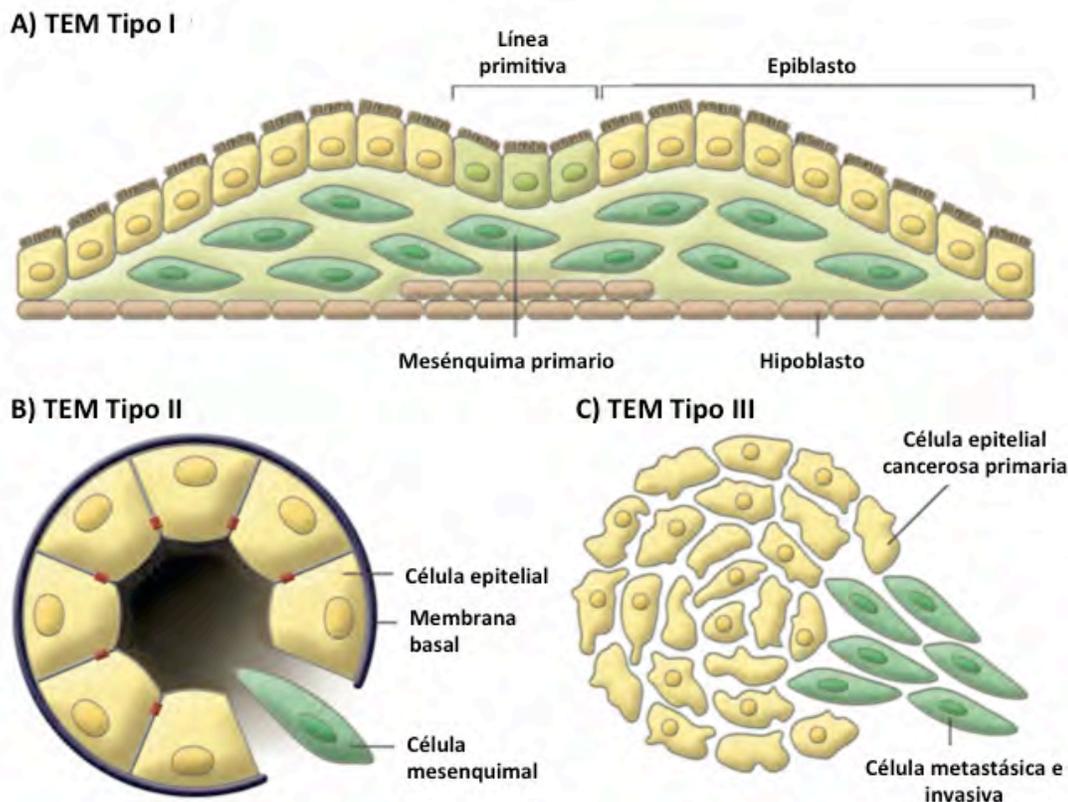
**Figura 1. Esquematación de los principales eventos fibrogénicos propuestos en la patogénesis de la FPI.** El epitelio alveolar es lesionado por una causa desconocida. Las células epiteliales alveolares activas liberan factores que inducen la migración y proliferación de los fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. Éstos secretan grandes cantidades de matriz extracelular perpetuando el daño y conduciendo a una remodelación aberrante del parénquima pulmonar. Imagen modificada de: Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory Research*. 2001; 3:3.

### Transición Epitelio Mesénquima y FPI

La transición epitelio mesénquima (TEM) es un proceso complejo y reversible que comienza con la ruptura de las uniones intercelulares y pérdida de la polaridad ápico-basal típica de las células epiteliales, las cuales se transforman en células mesenquimatosas con características migratorias, invasivas y eventualmente fibrogénicas [14]. En el desarrollo de la TEM participan distintos mecanismos moleculares que incluyen la activación de factores de transcripción, la expresión de proteínas de superficie específicas, la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, la producción de

enzimas que degradan la matriz extracelular (MEC) y cambios en la expresión de microARNs [15].

La TEM puede presentarse en tres entornos biológicos distintos que tienen consecuencias funcionales muy diferentes y según los cuales se ha propuesto su clasificación en tres subtipos. La TEM tipo I ocurre durante la implantación, la formación del embrión y el desarrollo de los órganos, un proceso organizado para generar diversos tipos celulares que comparten fenotipos mesenquimatosos comunes y nunca causan fibrosis o inducen un fenotipo invasivo. Entre otras cosas, las TEM tipo I pueden generar células mesenquimales (mesénquima primario) que tienen el potencial de experimentar el proceso reverso llamado transición mesénquima-epitelio (TME) para generar epitelio secundario. La TEM tipo II, se asocia con la cicatrización y la regeneración de tejidos. En esta, el programa comienza como parte de un evento de reparación que normalmente genera fibroblastos y otras células relacionadas para reconstruir los tejidos luego de un trauma o daño inflamatorio. En contraste con la TEM tipo I, la tipo II está asociada con inflamación y, en el caso de la cicatrización y la regeneración tisular, cesa una vez que la inflamación es atenuada. En el contexto de la fibrosis, la TEM tipo II puede perdurar y conducir a una destrucción eventual del órgano afectado. Finalmente, la TEM tipo III es aquella que ocurre en células neoplásicas que previamente han sufrido cambios genéticos y epigenéticos, específicamente en genes que favorecen el crecimiento clonal y el desarrollo de tumores localizados. Dichos cambios, que afectan notablemente a oncogenes y genes supresores de tumores, en conjunto con las vías regulatorias de la TEM, producen resultados muy diferentes de los observados en los otros dos tipos de TEM. Las células de carcinoma que desarrollan una TEM tipo III pueden invadir y hacer metástasis, generando las manifestaciones finales de la progresión del cáncer (**Figura 2**). Es importante notar que las células pueden pasar a través de diferentes grados de TEM, con algunas células que conservan muchos rasgos epiteliales al adquirir algunos mesenquimales (TEM parcial) y otras células que eliminan todos los vestigios de su origen epitelial y se vuelven completamente mesenquimatosas [15].



**Figura 2. Subtipos de transición epitelio-mesénquima (TEM) según el entorno biológico en el que se desarrolla.** La TEM tipo I está asociada con la implantación del embrión y la gastrulación, dando lugar al mesodermo y endodermo y a células móviles de la cresta neural. La TEM tipo II se presenta en un contexto inflamatorio y en la fibrosis. La TEM tipo III se refiere a aquella que puede presentarse en epitelios secundarios asociados a muchos órganos y que pueden transformarse en células cancerosas, haciendo posible la invasión y la metástasis. Imagen tomada de: Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.

Aunque el papel preciso de la TEM en la patogénesis de la fibrosis aún no ha sido esclarecido, la transdiferenciación hacia miofibroblasto ha sido identificada como un factor que promueve fibrosis en diversos órganos como pulmón, hígado y riñón [16-18]. Los miofibroblastos pueden ser considerados como fibroblastos activados, capaces de proliferar y sintetizar mayores cantidades de matriz extracelular en comparación con los fibroblastos [16, 19, 20]. Por tanto, la TEM que ha sido identificada tanto en el epitelio alveolar como en vías aéreas, podría ser una de las principales fuentes de células mesenquimales patogénicas durante la fibrogénesis pulmonar.

Las CEAs tienen la capacidad tanto de producir como de responder a mediadores profibróticos, regular la función y diferenciación de los fibroblastos liberando una variedad de mediadores, y modificar la morfología celular y la expresión génica en respuesta al daño [21-26]. En la FPI las CEAs son morfológicamente anormales, presentes como neumocitos hiperplásicos y células elongadas reactivas que recubren los focos de fibroblastos, los cuales son considerados como los sitios presumibles de fibrogénesis activa [27-29]. Los patrones de expresión de citoqueratina, un marcador de células epiteliales, están alterados [30] y hay un aumento en la apoptosis de CEAs adyacentes a los focos de fibroblastos [31-33]. Las CEAs activadas en FPI, sintetizan una variedad de factores procoagulantes tales como los inhibidores de la activación de plasminógeno (PAI-1 y PAI-2 por sus siglas en inglés) [34]. También se ha observado un aumento en la síntesis de citocinas fibrogénicas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta ( $TGF\beta$ ), factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), endotelina-1, y factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), permitiendo una señalización bidireccional entre CEA y fibroblastos, y entre estas y la matriz extracelular, en la que cada una de ellas influencia el comportamiento celular y los cambios del microambiente. Las CEAs también producen metaloproteasas de matriz (MMPs), lo que sugiere que el epitelio alveolar contribuye significativamente a la remodelación de la MEC [35, 36].

Como es de notar, tanto la TEM como todos los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y la progresión de la FPI se encuentran modulados por una gran variedad de proteínas con múltiples funciones que establecen complejas redes de señalización celular. La regulación de dichas cascadas de señalización se lleva a cabo, en gran medida, por enzimas llamadas proteasas, de cuya función y balance depende el buen funcionamiento del organismo o el desarrollo de procesos patológicos como la FPI.

### **Regulación Proteolítica**

Inicialmente, las proteasas eran consideradas como simples enzimas necesarias para el catabolismo de las proteínas y para la generación de aminoácidos en organismos

primitivos [37]. Sin embargo, se ha demostrado que su papel en la fisiología celular es mucho más amplio, involucrando procesos biológicos tan variados como la regulación del apetito, la regulación de la localización y actividad de muchas proteínas, la modulación de interacciones proteína-proteína y la creación de nuevas moléculas bioactivas. También contribuyen al procesamiento de información celular generando, transduciendo y amplificando numerosas señales moleculares. Como resultado directo de la acción múltiple de las proteasas se observan efectos sobre la replicación y transcripción del ADN, proliferación y diferenciación celular, morfogénesis y remodelación tisular, neurogénesis, ovulación, fertilización, cicatrización, movilización de células troncales, hemostasia, coagulación sanguínea, inflamación, autofagia, senescencia, muerte celular (necrosis y apoptosis) y la inmunidad [37].

Las proteasas exhiben una gran variedad de diseños, empezando por unidades catalíticas simples (20 kDa) hasta grandes y sofisticadas maquinarias de procesamiento (0.7-6 MDa) [38]. Y, aunque algunas de ellas presentan alta especificidad para su sustrato, la gran mayoría son relativamente inespecíficas y, en algunos casos, incluso pueden unirse a diferentes sustratos de manera indiscriminada. No obstante, la mayoría de las proteasas operan en un contexto de complejas redes que involucran distintas proteasas, sustratos, cofactores, inhibidores, adaptadores, receptores y proteínas de unión [37].

Actualmente, la base de datos Degradome, enlista 569 proteasas humanas y sus homólogos clasificados en 68 familias [39], de las cuales las metaloproteasas y las serín-proteasas son las clases más densamente pobladas con 194 y 176 miembros respectivamente [37].

### **Clasificación General de las Proteasas**

Las proteasas pueden clasificarse de varias maneras. De acuerdo con el sitio de corte se distinguen dos grupos: las endopeptidasas, dirigidas contra enlaces peptídicos internos, y las exopeptidasas, cuya acción es dirigida contra el extremo  $\text{NH}_2$  y  $\text{COOH}$  del sustrato correspondiente [37]. Según el tipo de mecanismo que emplean para la catálisis se han clasificado en seis grupos: 1) aspárticas, 2) glutámicas, 3) metaloproteasas, 4) cisteín, 5)

serín y 6) treonín proteasas. Los primeros tres grupos utilizan una molécula de agua activada como nucleófilo para atacar el enlace peptídico del sustrato, mientras que en los últimos tres grupos el nucleófilo es un residuo de aminoácido (Cys, Ser, Thr respectivamente) [37].

### **Niveles de complejidad**

Muchas proteasas unen sus dominios catalíticos a una serie de módulos o dominios especializados funcionalmente, mismos que ayudan a proveerlas de especificidad de sustrato, guiar su localización celular, modificar sus propiedades cinéticas y cambiar su sensibilidad a inhibidores endógenos [37].

Los dominios no catalíticos incluyen señales de clasificación arquetípica que dirigen a las proteasas a su localización apropiada, prodominios autoinhibitorios que previenen su activación prematura y dominios auxiliares que facilitan interacciones homotípicas o contactos heterotípicos con otras proteínas, sustratos, receptores o inhibidores [37].

La complejidad de las proteasas también se ve incrementada a través de eventos postranscripcionales como cortes alternativos, poliadenilación de genes, variaciones en el número de copias del gen o variantes polimórficas [40, 41], y procesos postraduccionales como glucosilación y fosforilación [37].

### **Serín-proteasas transmembranales**

Tanto las proteasas pericelulares como aquellas asociadas a la membrana regulan el comportamiento celular en condiciones fisiológicas, durante el desarrollo embrionario y en diversas patologías como cáncer, aterosclerosis, artritis y procesos neurodegenerativos, pudiendo estar involucradas en la iniciación o en la progresión de dichos padecimientos [42].

Las proteasas transmembranales influyen el comportamiento celular mediante dos mecanismos fundamentales [43-45]. El primero es a través de modificaciones proteolíticas

de la matriz extracelular, afectando la comunicación entre la célula y su ambiente circundante, mientras que el segundo consiste en la activación de factores de crecimiento latentes, citocinas y hormonas.

De acuerdo al tipo de anclaje las serín-proteasas transmembranales se clasifican en 3 familias [46]: a) Las serín-proteasas transmembranales Tipo I que se encuentran ancladas a la membrana a través de un dominio transmembranal carboxilo-terminal; b) Las llamadas GPI (glucosil-fosfatidilinositol) que se encuentran vinculadas a través de una unión glucosil-fosfatidilinositol. Estas dos familias poseen una señal secretora amino-terminal típica y un dominio hidrofóbico en su extremo carboxilo; c) Las serín-proteasas transmembranales Tipo II (TTSP) que presentan un dominio transmembranal amino-terminal con una extensión citoplásmica corta [47, 48] y una región extracelular de longitud variable que contiene dominios estructurales modulares.

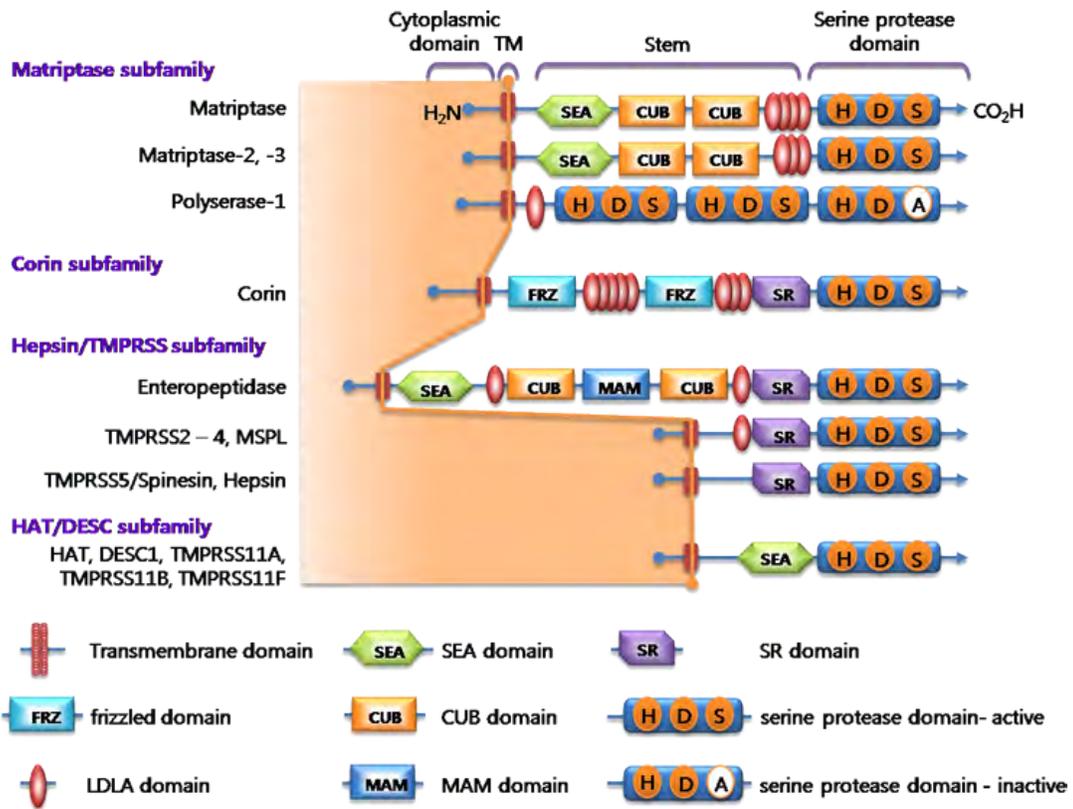
Muchas de las serín-proteasas asociadas a la membrana celular muestran evidencia de cortes alternativos de mRNAs, dando lugar a variantes con diferentes longitudes que resultan en isoformas alternativas de las proteasas. Sin embargo, en la mayoría de los casos la implicación fisiológica de dichas variantes no se conoce con precisión.

### **Serín-proteasas transmembranales tipo II (TTSP)**

La familia humana de las TTSPs comprende 17 miembros divididos en cuatro subfamilias [49]: 1) Subfamilia Matriptasa, 2) Subfamilia Corina, 3) Subfamilia Hepsin/TMPRSS (*transmembrane protease/serine*) y 4) Subfamilia HAT/DESC (*human airwaytrypsin-like protease/differentially expressed in squamous cell carcinoma*) (**Figura 3**).

El estudio de esta familia de enzimas resulta relevante dado que, como se ha mencionado previamente, la proteólisis en la superficie celular ha surgido como un mecanismo importante en la generación de proteínas biológicamente activas que regulan una amplia gama de funciones celulares [47, 50]. En este contexto, las TTSP se encuentran en una posición ideal para interactuar con otras proteínas en la superficie celular, con proteínas solubles, con moléculas de la matriz extracelular y con proteínas en las células

adyacentes. Además, este grupo de proteasas posee un dominio citoplásmico N-terminal que sugiere posibles funciones en la transducción de señales intracelulares [47, 50]. Adicionalmente, se ha observado que la expresión de muchas de las TTSPs se encuentra alterada en diversas patologías entre las que destaca el cáncer, un padecimiento en el que la proteólisis desregulada se considera una característica distintiva que permite el crecimiento, sobrevivencia y expansión de las células malignas.



**Figura 3. Estructura multidominio de las TTSPs humanas y su clasificación en cuatro subfamilias.** Tomado de: Park Y. TMPRSS4 (transmembraneprotease, serine 4). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2010; 14(8):785-787.

### *Características estructurales de las TTSPs*

Las TTSPs comparten una serie de características estructurales [47, 48, 50] (**Figura 3**) que incluyen:

- a) un dominio proteolítico
- b) un dominio transmembranal
- c) un dominio citoplásmico corto
- d) una región troncal de longitud variable que contiene dominios estructurales modulares, mismos que unen los dominios transmembranal y catalítico.

Los dominios proteolíticos de las TTSPs muestran un alto grado de identidad en su secuencia. Aquellos residuos necesarios para la actividad catalítica (histidina, aspartato y serina) se encuentran en motivos altamente conservados [47].

Todas las TTSPs son sintetizadas como zimógenos de cadena simple y probablemente son activadas por un corte de una arginina o una lisina presente en un motivo de activación altamente conservado, pudiendo presentar actividad autocatalítica [47, 48]. Debido a la presencia de un enlace bisulfuro que une los dominios pro- y catalítico se ha postulado que estas proteasas permanecen ancladas a la membrana después de su activación; sin embargo, se han aislado formas solubles de la enteropeptidasa [51, 52], de HAT [53] y de la matriptasa [54], lo que sugiere que los dominios extracelulares de al menos algunas de ellas pueden separarse de la superficie celular.

Los dominios citoplásmicos de las serín-proteasas transmembranales tipo II van de 12 hasta 112 aminoácidos de longitud (en la corina murina) y se desconoce el potencial de interacción de estos dominios con componentes del citoesqueleto y moléculas de señalización. Sin embargo, algunas TTSPs como la corina, la matriptasa y TMPRSS2 contienen sitios consenso de fosforilación para PKC (*proteinkinase C*) y CK2 (*caseinkinase 2*) [47, 55]. Es probable que tanto el

dominio citoplásmico como el transmembranal contribuyan a focalizar las TTSPs en una superficie particular en células polarizadas.

La región troncal de las TTSPs puede conformarse por una mezcla de 11 dominios estructurales que pueden servir como dominios regulatorios o de unión, siendo el más común el dominio de receptor clase A para lipoproteínas de baja densidad (LDL) [47, 48](**Figura 3**).

### *Distribución*

En general, las serín-proteasas transmembranales exhiben patrones de distribución muy restringidos en tejidos normales, lo que indica que probablemente tienen funciones tejido-específicas [47]. No obstante, la expresión celular de estas enzimas se ve desregulada durante la progresión tumoral, tal es el caso de TMPRSS4, una proteasa recientemente caracterizada que fue identificada como consecuencia de su marcada sobre-expresión en tumores pancreáticos [56] pero virtualmente ausente en páncreas normal.

La mayoría de las TTSPs han sido descritas de manera relativamente reciente y como consecuencia aún no han sido caracterizadas extensamente [47]. En este contexto, resulta importante señalar que el papel fisiológico y los blancos endógenos específicos de la mayoría de las serín-proteasas transmembranales aun no han sido identificados, por lo que un mejor entendimiento de la biología de este grupo de proteasas podría ser importante en el combate contra múltiples enfermedades.

## **TMPRSS4**

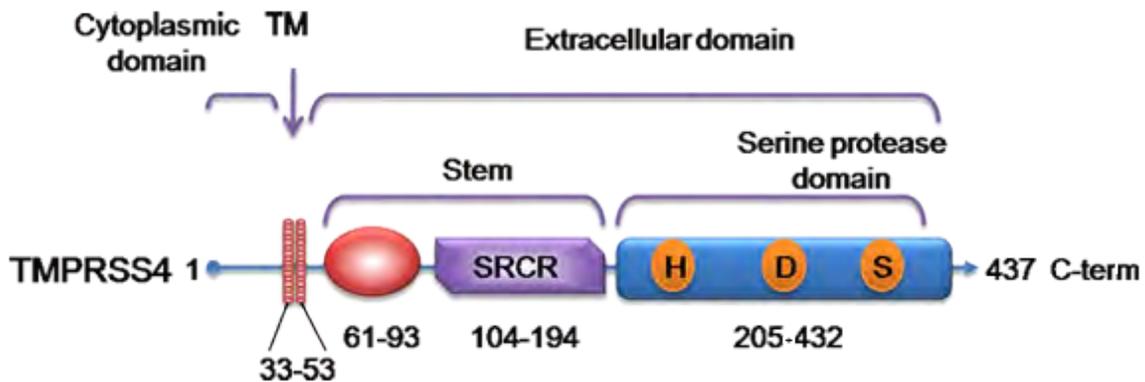
TMPRSS4 es una serín-proteasa transmembranal tipo II descrita recientemente. Aunque sus funciones son desconocidas, se ha observado que esta enzima se encuentra sobre-expresada en tejidos cancerosos de páncreas, colon, estómago, tiroides y pulmón [57].

El cDNA completo de esta enzima fue clonado y designado inicialmente como TMPRSS3 [56], un nombre asignado a una proteína cercana en el cromosoma 21q22.3. Posteriormente, TMPRSS4 fue mapeada en el cromosoma 11q23.3, reportándose dos variantes generadas por corte alternativo que producen transcritos de 2.12 y 1.98 Kb [58].

### *Estructura*

La proteína TMPRSS4 presenta una longitud de 437 aminoácidos. Consta de un dominio citoplásmico corto NH-terminal, un solo cruce transmembranal y un dominio serín-proteasa en el extremo C-terminal con tres residuos catalíticos (histidina, aspartato y serina) seguido por un dominio rico en cisteínas (SRDR) y un dominio de receptor clase A para lipoproteínas de baja densidad (LDL) [58](**Figura 4**).

La TMPRSS4 cuenta con un homólogo murino llamado CAP-2. El porcentaje de identidad entre la enzima humana y la murina es del 77.2% [59].



**Figura 4. Estructura de la proteasa transmembranal TMPRSS4.** TMPRSS4 presenta un solo cruce transmembranal, con un dominio citoplásmico corto amino-terminal. La parte extracelular (carboxilo-terminal) está compuesta por tres dominios modulares, incluyendo el dominio catalítico. Tomado de: Park Y. TMPRSS4 (transmembraneprotease, serine 4). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2010; 14(8):785-787.

#### *TMPRSS4 en condiciones fisiológicas*

Mientras que la función de la proteasa humana en condiciones normales no se conoce con exactitud, la TMPRSS4 murina ha sido descrita como parte de la familia de proteínas activadoras de canales de calcio (ENaC) que comprende CAP-1, -2 y -3. Dichos canales son importantes ya que regulan la concentración de sodio extracelular y, en su momento, balancean el volumen y la presión sanguínea controlando la reabsorción del fluido [60, 61]. La participación de TMPRSS4 en la regulación de ENaC era esperable dado que existen otros miembros de la familia TTSP que han sido implicadas en este proceso, como es el caso de la matriptasa/MT-SP1 murina [62]. Y, aunque en el humano no ha sido investigado a profundidad, un estudio publicado recientemente [63] sugiere la participación de TMPRSS4 en la activación de ENaC mediante la inducción de un corte en la subunidad  $\gamma$  en la vecindad del sitio de corte de la furina. Cabe mencionar que en pacientes con cáncer pulmonar frecuentemente se observa la acumulación de fluido alveolar, mismo que ha sido asociado con la disminución

en la expresión de ENaC generada por las condiciones de hipoxia en el microambiente tumoral [64]. En este sentido, la sobreexpresión de TMPRSS4 reportada en dicho padecimiento podría representar un mecanismo compensatorio para la disminución de ENaC [59].

Por otra parte, en un estudio reciente se ha sugerido que TMPRSS4 podría desempeñar un papel importante en estados tempranos del desarrollo embrionario y en la diferenciación tisular, dirigiendo probablemente su actividad hacia moléculas de adhesión [65]. Dicho estudio se llevó a cabo con un homólogo de TMPRSS4 en embriones de pez cebra que mostraron expresión de la proteasa desde las 5 h post-fertilización. El silenciamiento de TMPRSS4 generó una organogénesis general alterada con repercusiones sobre la formación del músculo esquelético, la frecuencia cardíaca y el sistema vascular. De manera interesante, se observaron marcados defectos en el tejido epidérmico, con alteraciones en los contactos célula-célula y en la organización de la piel. Otras TTSPs asociadas al crecimiento celular y el proceso de desarrollo en mamíferos son la hepsina, la enteropeptidasa, HAT, la matriptasa/MT-SP1 y la corina [46].

La correlación de las observaciones anteriores con funciones que se han visto alteradas en algunas patologías como el cáncer, en donde TMPRSS4 aparentemente modula la adhesión célula-célula, célula-matriz extracelular y la migración, representan un primer panorama sobre la posible función que esta proteasa podría estar desempeñando en condiciones fisiológicas.

#### *TMPRSS4 en condiciones patológicas*

Diferentes estudios han demostrado un marcado incremento en la expresión celular de TMPRSS4 en diversos procesos patológicos entre los que destacan varias neoplasias en las que esta enzima parece participar tanto en su desarrollo como en la progresión tumoral. Así, una expresión elevada de TMPRSS4 ha

sido reportada en cáncer pancreático, colorectal y cánceres metastásicos a través de diversas metodologías incluyendo análisis por microarreglos y RT-PCR [66-70].

Los mecanismos por los cuales esta enzima favorece el desarrollo de cáncer no se conocen con precisión. Se ha sugerido que TMPRSS4 controla el potencial de invasión y metástasis de células cancerosas humanas facilitando la transición epitelio mesénquima (TEM) [57]. Aunque este proceso puede ser inducido de manera experimental, *in vivo* ocurre solamente durante el desarrollo embrionario y en algunas condiciones patológicas como la progresión y el desarrollo de metástasis en cáncer y en desórdenes fibróticos como la fibrosis pulmonar [71].

Dentro de este marco, en un estudio realizado en el año 2008 se observó que la sobreexpresión de TMPRSS4 en células SW480 (carcinoma de colon) inducía la pérdida de la adhesión celular mediada por E-caderina concomitantemente con la transcripción de su represor SIP1/ZEB2 [57]. Esto condujo a eventos moleculares asociados a TEM, mismos que incluyeron cambios morfológicos de estas células neoplásicas, la reorganización de la actina y el aumento de marcadores mesenquimales. Dos años más tarde, el mismo grupo de trabajo reportó que TMPRSS4 induce la expresión de la integrina  $\alpha 5$ , conduciendo a invasión y TEM [72]. En este contexto, se mostró que TMPRSS4 activa múltiples rutas de señalización incluyendo: Akt, Src, FAK, Rac1 y ERK. Notablemente, la inhibición de PI3K o Src disminuyó la invasividad y el rearrreglo de la actina inducido por TMPRSS4 sin que se restableciera la expresión de E-caderina. Por su parte, FAK, Rac1 y ERK son los mayores efectores de las integrinas, hecho que correlacionó con la expresión aumentada de la integrina  $\alpha 5$  inducida por TMPRSS4. De este modo, se ha propuesto la sobre-expresión de la integrina  $\alpha 5$  como un mecanismo molecular por el cual TMPRSS4 induce invasión y contribuye a la progresión del cáncer.

Este concepto fue corroborado en un estudio posterior en células de cáncer de pulmón [73]. En ellas, el silenciamiento de TMPRSS4 resultó en una reducción de los niveles de integrina  $\alpha 5$ , situación que abrogó la migración celular, disminuyó la capacidad de adherirse a la fibronectina y redujo el crecimiento tumoral *in vivo*. Esto concuerda con el hecho de que las integrinas son moléculas fundamentales en las interacciones célula-MEC. En este estudio también se identificó a la integrina  $\alpha 5$  como un nuevo blanco directo para miR-205 en el carcinoma pulmonar de células no pequeñas, cuya sobreexpresión parece promover un fenotipo epitelial con aumento de E-caderina y reducción en los niveles de fibronectina. Adicionalmente, un análisis de microarreglos mostró que la sobre-expresión de miR-205 coincide con la disminución de los niveles de TMPRSS4. Dicha sobreexpresión generó arresto celular en la fase  $G_0/G_1$  e inhibición del crecimiento celular y de la migración, y en consecuencia, del crecimiento del tumor primario y de la formación de metástasis *in vivo*. Cabe destacar que entre los blancos descritos para miR-205 se encuentran ZEB1 y SIP1 [74], ERBB3 y VEGF-A [75], PKC $\epsilon$  [76] y la proteína 1 del receptor LDL, concordando este último con uno de los dominios modulares extracelulares de TMPRSS4. Todo lo anterior sugiere que una compleja red de interacciones moleculares entre TMPRSS4, mir-205 y la integrina  $\alpha 5$  contribuye al desarrollo y la progresión del cáncer.

En la búsqueda por esclarecer los mecanismos de acción de TMPRSS4, esta enzima también ha sido relacionada con el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) [77] otra serín proteasa bien conocida por su participación en invasión y metástasis. uPA cataliza la conversión del plasminógeno inactivo hacia plasmina activa la cual puede degradar la mayoría de las proteínas extracelulares y activar metaloproteasas de matriz (MMPs) para facilitar la invasión. TMPRSS4 difiere de uPA y las MMPs en que estas proteasas generalmente derivan de células mesenquimales asociadas al tejido canceroso mientras que TMPRSS4 es producida por las propias células cancerosas [57]. Los complejos de uPA-uPAR (receptor de uPA) interactúan en la superficie de la

célula tumoral con correceptores de integrinas para activar rutas de señalización intracelular involucradas en la migración, invasión, proliferación y sobrevivencia celular. Al igual que sucede con TMPRSS4, niveles elevados de uPA correlacionan con propiedades invasivas y mal pronóstico en diversos tipos de cáncer, incluyendo los de mama, pulmón, estómago, vejiga, colon, próstata y ovario. En este contexto, resulta interesante la relación entre estas dos enzimas ya que se ha reportado que TMPRSS4 convierte directamente el pro-uPA inactivo en su forma activa, sugiriendo que TMPRSS4 es un regulador *in situ* de la activación de pro-uPA [78]

Además de investigarse en cáncer, el papel de TMPRSS4 ha sido evaluado, menos extensamente, en la infección por el virus de la influenza en donde se ha reportado que TMPRSS4 activa la hemaglutinina (HA) del virus. Tal activación resulta de gran relevancia dado que la proteólisis de la HA por las proteasas de la célula hospedera es esencial para la infección viral [55].

En resumen, múltiples evidencias demuestran que las proteasas regulan el comportamiento celular durante el desarrollo embrionario y después del nacimiento en condiciones fisiológicas y en diversas patologías. Dado que las proteasas catalizan esencialmente reacciones de hidrólisis irreversibles, su función debe ser estrictamente regulada [37]. Así, se ha observado que cuando la expresión celular de estas enzimas se encuentra alterada se favorece el desarrollo de muchas patologías como el cáncer, la aterosclerosis, la artritis y algunos procesos neurodegenerativos, pudiendo estar involucradas en la iniciación o en la progresión de dichos padecimientos [42]. Por estas razones, las proteasas, incluyendo las transmembranales, constituyen un importante blanco terapéutico para el desarrollo de nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), resultando de gran importancia profundizar en los mecanismos celulares a través de los cuales estas enzimas ejercen sus funciones.

## **HIPÓTESIS**

La sobreexpresión de TMPRSS4 favorece la inducción de la TEM en el pulmón y con ello el desarrollo y la progresión de la FPI.

## **OBJETIVOS**

### **General:**

Evaluar el papel de TMPRSS4 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar experimental y humana (FPI) así como su utilidad como biomarcador diagnóstico y pronóstico de la FPI.

### **Particulares:**

- 1) Determinar las diferencias en la expresión de TMPRSS4 en tejidos provenientes de pacientes con FPI comparados con tejido pulmonar normal y evaluar su localización.
- 2) Medir los niveles de TMPRSS4 en suero y plasma de pacientes con FPI, neumonitis por hipersensibilidad (NH) y neumopatía intersticial difusa asociada enfermedad autoinmune y compararlos con sujetos sanos.
- 3) Evaluar el papel de la ausencia/presencia de TMPRSS4 en el desarrollo y la patogénesis de la fibrosis pulmonar en un modelo experimental con ratones deficientes de TMPRSS4.

- 4) Establecer la participación de Tmprss4 en la inducción de TEM en células epiteliales de pulmón.

## **METODOLOGÍA**

### **RT-PCR y PCR Cuantitativa**

Se cuantificó la expresión de Tmprss4 en homogenados de pulmón provenientes de pacientes con FPI y neumonitis por hipersensibilidad (NH). Como control se utilizó ARN de pulmones normales obtenidos de casas comerciales (Ambion AM7968, Agilent 540019). Para algunos experimentos se utilizó ARN de diferentes cultivos celulares. El ARN total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). Posteriormente se hizo una transcripción reversa con 1 µg de ARN total para sintetizar el ADN complementario usando el estuche comercial *High-capacity CDNA reverse transcription kit* (Thermo Scientific, K1632) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación en tiempo real se realizó con sondas TaqMan marcadas con FAM o VIC específicas para los genes de interés. La PCR se llevó a cabo mezclando 2 µl de ADNc, 7.5 µl Master Mix, 0.2 µl sonda TaqMan y 5.3 µl de agua. Las sondas TaqMan fueron diseñadas por Applied Biosystems (4331182), misma compañía con la que se obtuvo el reactivo TaqMan PCR Master Mix (4304437). La PCR en tiempo real fue realizada en el equipo Rotor-Gene Q Instrument (QIAGEN, Hilden, Germany). Todas las muestras se corrieron por triplicado y usando el ARNr 18S como control endógeno. Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar.

## **Cultivo Celular**

Se cultivaron células epiteliales alveolares (A549; CCL-185) y bronquiales (HBE4-E6/E7; CRL-2078) humanas, células epiteliales de pulmón de rata (RLE-6TN; CRL-2300) y fibroblastos pulmonares humanos de las líneas CCD-25Lu (CCL-215) y CCD-8Lu (CCL-201) que fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MA). Las células se cultivaron en incubadoras a 37°C con una mezcla de gases en proporción 5% de CO<sub>2</sub> / 95% de aire en cajas T-25 cm<sup>2</sup> (T-25; Corning, Costar) que contenían medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2.5 mg/mL de anfotericina B.

Las células A549 y los fibroblastos fueron cultivadas con medio F12 (GIBCO, 21700-075), mientras que las células bronquiales se crecieron en Defined Keratinocyte-SFM (GIBCO, 10744) suplementado con extracto de pituitaria bovina (0.05 mg/mL), factor de crecimiento epidérmico (5 ng/mL) y toxina de cólera (10 ng/mL). Para las células RLE-6TN se utilizó el medio Ham's F12 suplementado con extracto de pituitaria bovina (0.01 mg/mL), insulina (5 ng/mL), factor de crecimiento similar a la insulina (2.5 ng/mL), transferrina (1.25 µg/mL), EGF (2.5 ng/mL) y 10% SFB.

Todos los cultivos se mantuvieron en las condiciones antes mencionadas y en el medio correspondiente hasta su uso para los experimentos.

## **ELISA**

Se obtuvo plasma (n=10) y suero (n=4) de pacientes con FPI, NH y neumopatía intersticial difusa asociada con enfermedad autoinmune. Se analizaron 100 µl de cada muestra con un estuche de ELISA para Tmprss4 humana (Cloud-Clone Corp., USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, las

muestras y las soluciones estándar fueron colocadas en una microplaca previamente revestida con un anticuerpo específico para TMPRSS4 conjugado con biotina. Posteriormente, se incubaron con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con avidina y después se adicionó un sustrato (TMB). Sólo aquellos pozos que contienen TMPRSS4 unido al anticuerpo conjugado con biotina y la enzima conjugada con avidina exhibieron un cambio de color. La reacción enzimática se terminó con una solución de ácido sulfúrico y el cambio de color fue medido en un lector de ELISA (Synergy HT, BioTek) a una longitud de onda de  $450 \text{ nm} \pm 10$ . La concentración de TMPRSS4 en las muestras se determinó comparando la D.O. de las muestras con la curva estándar. Todas las muestras fueron trabajadas por duplicado.

### **Tasa de Crecimiento (A549 y Fibroblastos)**

Se sembraron células epiteliales alveolares de la línea A549 en placas de 96 pozos a una densidad celular de 2800 células por pozo y se incubaron en medio F12 con 10% SFB en condiciones estándar. Luego de 24 h, el medio fue reemplazado por medio sin suero o por medio con la proteína recombinante TMPRSS4 [15 10 y 100 ng/mL]. Las células se mantuvieron en cultivo por 48 o 96 horas y el crecimiento celular se determinó con el reactivo WST-1 (4-[50]-1,3-benzeno disulfonato) (Boehringer, Mannheim, Germany) como se ha descrito [79]. El WST-1 es metabolizado por las enzimas mitocondriales de las células viables generando un compuesto colorido (formazán), de modo que la intensidad del color es proporcional al número de células viables. Este ensayo colorimétrico se cuantificó mediante la valoración de la absorbancia en un lector de ELISA (Synergy HT, BioTek) a 450 nm y con una longitud de onda de referencia de 620 nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado para cada condición.

## Apoptosis por Citometría de Flujo

En el proceso apoptótico las células presentan diversos cambios morfológicos, entre los que se encuentra la translocación de la fosfatidilserina (PS) hacia la superficie celular mientras que el resto de la membrana plasmática permanece sin cambios. Así, es posible detectar la exposición de la PS mediante su afinidad con la Anexina V, una proteína de unión al fosfolípido, en presencia de calcio. Dado que esta molécula no penetra la bicapa lipídica de la membrana celular, no se adhiere a células viables. La Anexina V acoplada a FITC facilita la detección de células que experimentan apoptosis y, para discriminar entre células muertas y células en apoptosis, se agrega simultáneamente un marcador de ADN como el yoduro de propidio (PI).

Para analizar el efecto de TMPRSS4 sobre la muerte celular programada, se sembraron células epiteliales alveolares (A549) en placas de 6 pozos a una confluencia del 50% y se estimularon con TMPRSS4 (100 ng/mL) durante 96 hrs. Al concluir el experimento el medio de cada pozo fue recuperado en tubos de 5 mL para citometría y las células se lavaron con PBS. Posteriormente se agregó Tripsina diluida 0.5X con PBS y se incubó durante 3 min, parando la reacción enzimática con 2 mL de medio con 10% de SFB. Las células desprendidas fueron recuperadas en el mismo tubo de 5 mL para citometría y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. El sobrenadante se desechó decantando cuidadosamente y las células se lavaron nuevamente con PBS. Las células fueron resuspendidas en buffer de anexina 1 X del estuche comercial para detección de Apoptosis (BD Pharmingen™, 556547) para teñir con 2.5 µl de Anexina V-FITC y/o Ioduro de Propidio (IP), considerando siempre los siguientes controles:

<b>Tratamiento</b>	<b>Tinción</b>
Control sin tratamiento	Sin teñir
Postivo (Sts)	Anexina

Postivo (Sts)	IP
Postivo (Sts)	Anexina/IP

Una vez teñidas, las células fueron incubadas durante 15 min a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Transcurrido el tiempo se agregaron 350  $\mu$ l más de buffer de anexina. Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y se determinaron los porcentajes de la población total de células positivas para Anexina V-FITC y negativas para IP. Los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo (Stanford University, CA).

### **Ensayos de Migración Celular**

El análisis de migración de células epiteliales alveolares humanas inicialmente se llevó a cabo mediante el ensayo de la herida. Para ello, se sembraron células A549 a confluencia colocando un inserto circular en el centro de cada pozo. Una vez que las células se adhirieron a la placa el inserto se retiró cuidadosamente y se reemplazó el medio de cultivo por medio sin suero o medio con TMPRSS4 100 ng/mL. Las células se mantuvieron con el estímulo a diversos tiempos. El cierre de la herida se cuantificó midiendo el diámetro del espacio dejado por el inserto en cada tiempo con el software Image J y contrastando cada uno con el diámetro al momento de retirar el inserto. Los resultados obtenidos se corroboraron después utilizando cámaras de Boyden (Milipore, Temecula, CA) cubiertas con colágena tipo I con un tamaño de poro de 8  $\mu$ m. Se colocaron 200,000 células (A549) en el compartimento superior de la cámara y en el inferior se añadieron 500  $\mu$ l de medio con 5% de BSA (control) o con 100 ng/mL de la proteína recombinante humana de TMPRSS4. Como control positivo se usó SFB al 10%, ya que contiene diversos factores que podrían promover la migración. Las células se incubaron durante 96 hrs, después de lo cual, aquellas que no migraron se retiraron del compartimento superior, mientras que aquellas que migraron al compartimento inferior se tiñeron con cristal violeta.

Posteriormente, el colorante se eluyó con una solución de ácido acético al 10% y un volumen de 100  $\mu$ l se transfirió a una placa de 96 pozos. La lectura se realizó en un lector de ELISA (Synergy HT, BioTek) a una longitud de onda de 540 nm. Cada experimento se realizó por duplicado.

### **Inmunohistoquímica (IHC)**

Para conocer la localización celular de TMPRSS4 se examinaron cinco tejidos provenientes de pacientes con FPI y tres tejidos pulmonares normales. El análisis inmunohistoquímico se realizó como se ha reportado previamente [71]. Brevemente, se obtuvieron tejidos de biopsias o autopsias de individuos con FPI y controles siguiendo los protocolos institucionales aprobados por el comité de Bioética del INER. Las muestras de tejido fueron fijadas con formol amortiguado y colocadas en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 3  $\mu$ m de grosor que se montaron en laminillas silanizadas. Los cortes se desparafinaron en xilol por 30 min y después se rehidrataron con etanol al 100%, 90%, 50% y agua por 5 min cada uno. Posteriormente los tejidos fueron incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol por 30 min. Luego de realizar la recuperación antigénica con buffer de citratos a 90°C por 30 min y bloquear con 2% de suero normal de cerdo en PBS, para evitar uniones inespecíficas, las muestras se incubaron durante 18 h a 4°C con el anticuerpo monoclonal para TMPRSS4 [Santa Cruz Biotechnology/ sc-376415 (1:100)] diluido en PBS con 2% de suero. Transcurrido el tiempo las laminillas se lavaron con PBS 0.1% Tween 2.0 y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina acoplado a biotina seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (BioGenex, San Ramon, CA). Como sustrato se usó 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) en buffer de acetatos con 0.05% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente los tejidos se contra-tiñeron con hematoxilina (BioGenex). Para los controles negativos el anticuerpo primario fue reemplazado por suero normal de cabra [71]. Los pulmones provenientes del modelo murino de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina se trataron con el mismo protocolo

pero empleando un anticuerpo primario policlonal para TMRSS4 [Cusabio/CSB-PA023926GA01Hu (1:50)] que reconoce a la proteasa en ratón.

### **Tinción con Verde Metilo-Pironina y Azul de Toluidina**

Para realizar ambas tinciones, los cortes de los tejidos fueron colocados en laminillas galvanizadas y se desparafinaron con xilol para luego rehidratar con etanol al 100%, 96% y con agua corriente y destilada.

En el caso de la tinción con verde metilo-pironina (VMP) se prepararon dos soluciones stock, la primera de verde de metilo acuoso al 2% y la segunda de Pironina  $\gamma$  o G al 2%. Ambas soluciones fueron sometidas a 10 lavados con cloroformo por medio de un embudo de separación. El cloroformo fue lavado con carbón activado a través de un filtro y las soluciones se conservaron en refrigeración con una capa de cloroformo. La solución de trabajo se preparó agregando 9 mL de verde metilo, 4 mL de Pironina, 9 mL de glicerina y 22 mL de buffer de acetatos pH 4.4.

Luego de desparafinar, las laminillas se mantuvieron en buffer de acetatos pH 4.4 durante 10 minutos. Posteriormente se colocaron en la solución de trabajo por 25 minutos. Transcurrido el tiempo se realizó un enjuague en el mismo buffer y se dejaron secar. Una vez secas se realizó un enjuague con acetona/xilol y finalmente un enjuague más sólo en xilol. Terminado el proceso las laminillas se montaron.

En el caso de la tinción con Azul de Toluidina, las muestras se colocaron en la solución de azul de Toluidina de 20-60 min. Transcurrido el tiempo el tejido se deshidrató, se aclaró y se realizó el montaje. La solución de trabajo se preparó con Azul de Toluidina al 0.1%.

## **Inmunofluorescencia y microscopía confocal**

Para la inmunofluorescencia se utilizaron secciones de tejido de 3  $\mu\text{m}$  adheridas a laminillas silanizadas (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). Al igual que en la inmunohistoquímica, la recuperación del antígeno se indujo mediante calor en buffer de citratos. Después, los tejidos fueron permeabilizados y bloqueados en un solo paso con una incubación de 30 min a temperatura ambiente en PBS con 2% de suero normal de cerdo y Triton X-100 (Research Organic, Cleveland, OH, USA). Posteriormente, se lavaron e incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti-TMPRSS4 [Santa Cruz Biotechnology/ sc-376415 (1:100)], anti-Triptasa [Abcam/ ab-151757 (1:250)] y anti-Quimasa [Abcam/ ab-111239 (1:300)]. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente: Alexa Fluor[AF]-488 de burro conjugado con IgG anti-conejo, Dylight-549 de burro conjugado con IgG anti-ratón y AF-647 de burro conjugado con IgG anti-cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Todos los experimentos incluyeron controles con y sin anticuerpo primario o anticuerpo secundario. La obtención de las imágenes se realizó con un microscopio confocal FV-1000 de barrido laser (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) en modo de escaneo secuencial para obtener imágenes de cada fluorocromo por separado.

## **Western Blot**

Para este análisis se extrajo proteína total de células epiteliales alveolares (A549) y bronquiales (HBE4-E6/E7) humanas así como de fibroblastos pulmonares normales y de pacientes con FPI utilizando el buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, NaF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 1  $\mu\text{g/ml}$ , aprotinina 1  $\mu\text{g/ml}$  y pepstatina 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Los lisados celulares fueron sonicados y centrifugados a 14,000 rpm por 10 min a 4°C, luego se recuperó el sobrenadante y se determinó

la concentración de proteína por el método de Bradford utilizando el reactivo *BioRad Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules CA). Alícuotas de proteína de 40 µg se mezclaron con buffer Laemmli, se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS al 10% y se electro-transferieron a membranas de nitrocelulosa a 15V durante 40 min. Los sitios inespecíficos se bloquearon con leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.05% durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C: TMPRSS4 [Santa Cruz Biotechnology/ sc-376415 (1:500); Cusabio/ CSB-PA023926GA01HU (1:500)], E-caderina [BioGenex/ MU390-UC (1:150); Santa Cruz Botechnology/ sc-7870 (1:200)] y  $\alpha$ -SMA [SIGMA/ A2547 (1:100)], SNAIL [Santa Cruz Botechnology/ sc-393172 (1:200)]. En algunos experimentos, los lisados totales fueron obtenidos de células A549 estimuladas con 100 ng/mL de la proteína recombinante de TMPRSS4 (Origene/ TP303972) y/o 5 ng/mL de TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems/ 240-B/CF). Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 4 veces con TBS-tween 0.05% y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (Invitrogen Life Technologies) por 1 h a temperatura ambiente. La señal fue detectada por quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific / 34080) y se cuantificó mediante densitometría usando el software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Todas las muestras se normalizaron contra  $\beta$ -tubulina [Santa Cruz Biotechnology/ sc-5274HRP (1:200)] o  $\beta$ -actina [Santa Cruz Biotechnology/ sc-47778 (1:200)].

## **Fibrosis Pulmonar inducida con bleomicina**

### *Animales*

Los animales deficientes de TMPRSS4, con fondo genético C57BL/6, fueron obtenidos del *Mutant Mouse Resource & Research Center* (MMRRC) en la Universidad de California, Davis. Como controles se utilizaron animales

silvestres provenientes de las mismas camadas. Los ratones fueron alojados en instalaciones específicas libres de patógenos, fueron manejados asépticamente y recibieron comida y agua estéril *ad libitum*. Para los experimentos se emplearon animales de entre 8-12 semanas de edad.

### *Tipificación*

La genotipificación de los ratones se realizó por reacción directa en cadena de la polimerasa (PCR) con ADN genómico proveniente de tejido murino lisado. Para ello, se obtuvieron segmentos de cola de ratón de aproximadamente 1-2 mm de longitud que se colocaron en un tubo Eppendorf de 0.2 mL. Se agregaron 75 µL de NaOH 25 mM / EDTA 0.2 mM y se mantuvieron a 98°C por 1 hora. Transcurrido el tiempo se agregaron 75 µL de Tris-HCl para detener la hidrólisis. El ADN fue cuantificado y ajustado a una concentración de ~100 ng/mL. Todas las PCRs se realizaron usando 1 µL (~100 ng) de ADN con un protocolo de ciclaje con *touch-down* de 10 ciclos de alineación, comenzando a 65°C y bajando la temperatura 0.5°C cada ciclo para finalizar a 55°C los siguientes 30 ciclos. La iniciación y desnaturalización del ADN se llevaron a cabo a 94°C, mientras que la elongación y la amplificación se realizaron a 72°C, de acuerdo a las condiciones proporcionadas por el *Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC)*.

Los primers empleados fueron los siguientes:

sentido: AACTTCACAGAAGCACTGGCC

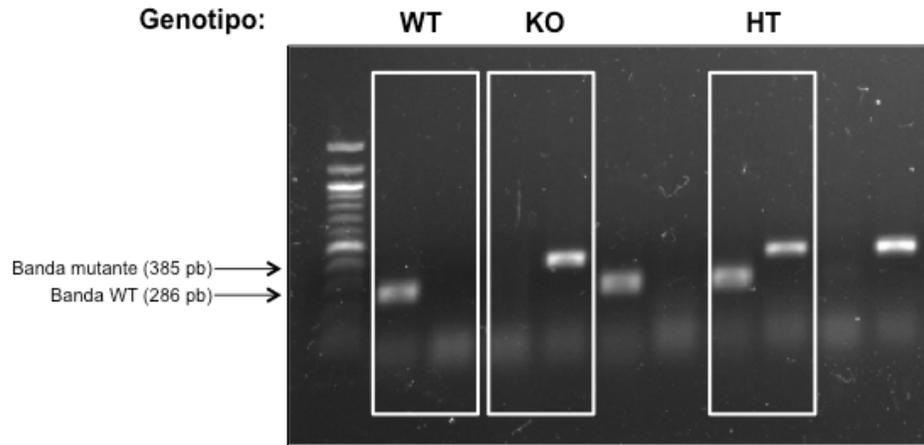
anti-sentido: TGGGATTCAAACGTGGTTCTT

sentido: GCAGCGCATCGCCTTCTATTC

anti-sentido: TGGGATTCAAACGTGGTCCTG

Finalmente, los productos se corrieron en geles de agarosa al 1% a 100 V por 35 min. El genotipo de los ratones se determinó de acuerdo con el tamaño de los

productos y el número de bandas obtenidas, tal y como se muestra en la **Figura 5**.



**Figura 5. Genotipificación de ratones de la cepa transgénica de *TMPRSS4*.** Los animales deficientes presentan sólo la banda del gen mutado de *TMPRSS4* (385 pb) mientras que los animales silvestres presentan el gen sin alterar (286 pb). Los animales haplodeficientes exhiben un alelo mutado y el otro normal, por tanto se aprecian ambas bandas en la genotipificación.

### *Anestesia*

Los ratones fueron anestesiados con AVERTIN, una mezcla de 222-tribromoetanol y t-amil alcohol, tanto para la instilación intratraqueal como para practicar la eutanasia al final de los experimentos, que se realizó mediante exanguinación/perfusión cardíaca. En este protocolo se realizaron todos los esfuerzos necesarios para evitar el sufrimiento animal.

### *Modelo animal*

Se realizó una curva dosis respuesta (1, 3, 5 y 7 U/kg) con Bleomicina en los animales de la cepa transgénica para *TMPRSS4*, obteniéndose el mejor modelo de fibrosis pulmonar con la dosis de 7 U/kg (0.07 U/10g), la cual produjo una mortalidad similar (15-20%) entre animales silvestres (WT), haplodeficientes

(HT) y deficientes (KO). Los ratones WT, HT y KO fueron divididos al azar en dos grupos, el primero instilado con PBS (grupo control) y el segundo con bleomicina (grupo experimental). El daño pulmonar se indujo con sulfato de bleomicina (BLEOLEM) disuelto en PBS estéril, mismo que se instiló intratraquealmente a la dosis óptima mencionada (volumen final: 50  $\mu$ l/ratón) en una sola aplicación. Los animales fueron sacrificados al día 28 post-instilación. Los pulmones fueron perfundidos con PBS para eliminar la sangre y posteriormente se extrajeron. En todos los casos, el pulmón izquierdo se utilizó para cuantificar el contenido de hidroxiprolina y el pulmón derecho se fijó con formol amortiguado y se colocó en un bloque de parafina. Los bloques de parafina con tejido pulmonar fueron cortados en secciones de 3  $\mu$ m de grosor y se tiñeron con hematoxilina (HE) y con Tricrómica de Masson. La gravedad de la fibrosis pulmonar se determinó usando un método histopatológico semicuantitativo. Primero, se determinó la extensión de las lesiones (0-100%), el grado de severidad de las mismas (1-3) y el porcentaje de fibrosis según lo observado con la tinción tricrómica. Finalmente, se calculó un índice fibrótico multiplicando la extensión de la lesión por el porcentaje de fibrosis [80].

#### *Ensayo de hidroxiprolina*

La cuantificación de colágena en el pulmón fue realizada mediante el ensayo de hidroxiprolina, tal y como se ha descrito previamente [81]. Para este ensayo, con el propósito de reducir la variabilidad, siempre se usó el pulmón izquierdo de los animales. Los datos se expresaron como microgramos de hidroxiprolina por pulmón.

#### **Aprobación Ética del protocolo y consentimiento de participación**

La donación de tejido de pacientes así como todos los experimentos para este protocolo de estudio fueron realizados de acuerdo con las guías institucionales vigentes. Se obtuvo un consentimiento individual firmado por cada paciente. El uso de animales cumplió con todas las pautas marcadas por las Guías de

Cuidado Animal. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética y Comité de Bioseguridad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) (B30-12) en la ciudad de México.

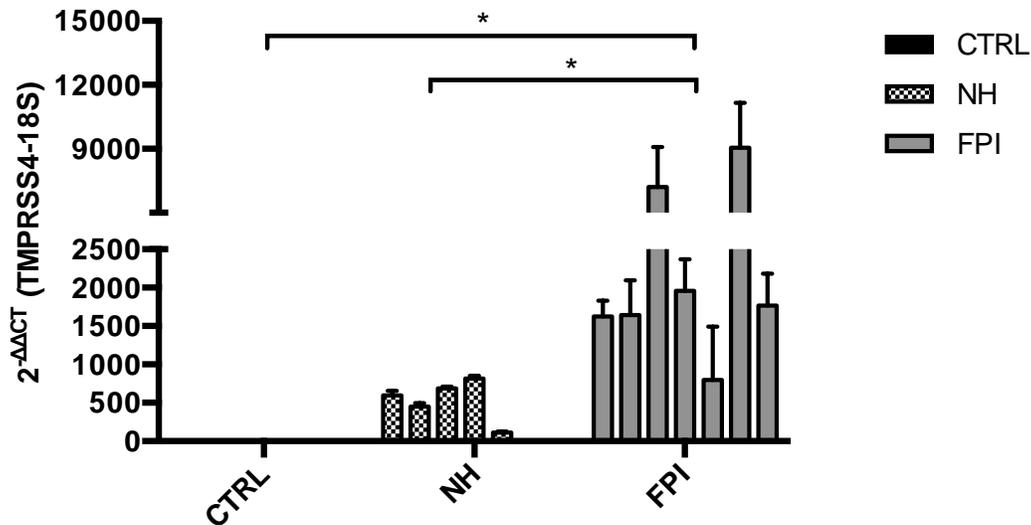
### **Análisis estadístico**

Los resultados derivados de la PCR en tiempo real en tejidos fueron evaluados mediante una prueba de t (paramétrica) con corrección de Welch. Para los demás experimentos, los valores de P fueron calculados usando un ANOVA de una vía. Todos los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  DS de al menos 3 o 4 determinaciones. Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## **RESULTADOS**

### **TMPRSS4 está sobre-expresada en pulmones con FPI**

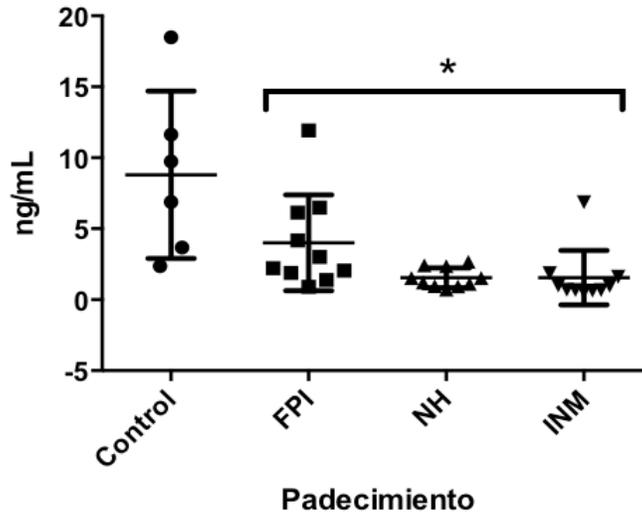
Primero, se evaluó la expresión de TMPRSS4 en muestras de pulmón provenientes de pacientes con FPI (FPI, n=7) comparados con tejido normal (PN, n=4) y con pulmones de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad (NH, n=6). Las muestras de NH se usaron porque esta representa una neumopatía intersticial difusa, principalmente inflamatoria, que a menudo involucra fibrosis. Como se muestra en la **Figura 6**, TMPRSS4 prácticamente no se expresa en pulmones normales mientras que se observa un aumento modesto en HP y una fuerte sobreexpresión en tejidos con FPI ( $p < 0.05$ , IPF versus controles and HP).



**Figura 6. TMPRSS4 está sobre-expresada en pulmones con fibrosis pulmonar idiopática (FPI).** Se cuantificó la expresión génica de TMPRSS4 por PCR en tiempo real en ARN total obtenido de sujetos con FPI (n=7), neumonitis por hipersensibilidad (NH) (n=6) y pulmón normal (n=4). Se observa una fuerte sobreexpresión en tejidos con FPI comparados con pulmones con NH y controles. Los datos se expresan como media  $\pm$  DS del número de copias normalizado con el ARNr 18S; \* $p < 0.05$ , FPI versus control y NH.

### La expresión de TMPRSS4 disminuye en plasma de pacientes con FPI comparado con sujetos sanos.

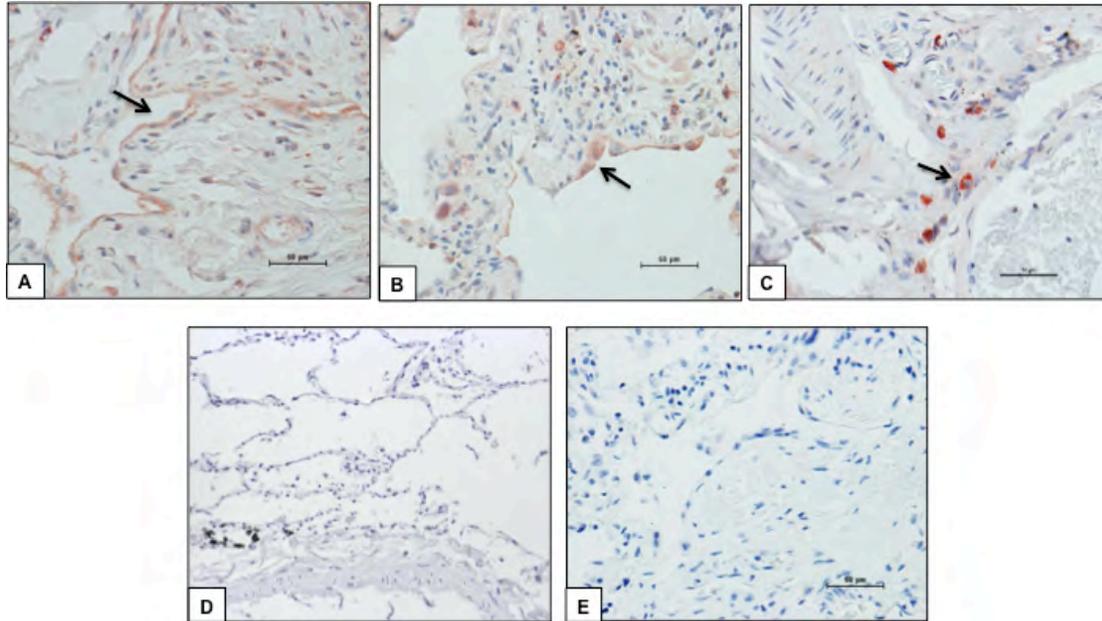
Con el fin de determinar la utilidad de TMPRSS4 como biomarcador diagnóstico y pronóstico de la FPI se midió la concentración de la proteína en suero y plasma provenientes de pacientes con FPI, NH y neumopatía intersticial difusa asociada a enfermedad autoinmune (INM) y se compararon contra sujetos sanos. Un primer acercamiento con 4 muestras por condición mostró, en su mayoría, niveles casi indetectables ( $< 0.5$  ng/mL) de TMPRSS4 en suero, mientras que en plasma los niveles fueron superiores. Por tal motivo, se decidió ampliar la muestra de plasmas (n=10) para todas las condiciones. Los resultados muestran una disminución significativa de TMPRSS4 en los plasmas de pacientes con FPI al comparar contra los controles. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los distintos padecimientos (**Figura 7**).



**Figura 7. TMPRSS4 disminuye en plasmas de pacientes con FPI, NH y enfermedad autoinmune.** Se cuantificó por ELISA la concentración de TMPRSS4 en plasmas obtenidos de sujetos sanos (n=10), con FPI (n=10), neumonitis por hipersensibilidad (NH) (n=10) y neumopatía intersticial difusa asociada a enfermedad autoinmune (INM) (n=10). Se observa una disminución en los niveles de TMPRSS4 en todos los padecimientos al comparar contra los controles, no así al comparar entre patologías. Los datos se expresan como media  $\pm$  DS; \* $p < 0.05$  FPI, NH e INM versus control.

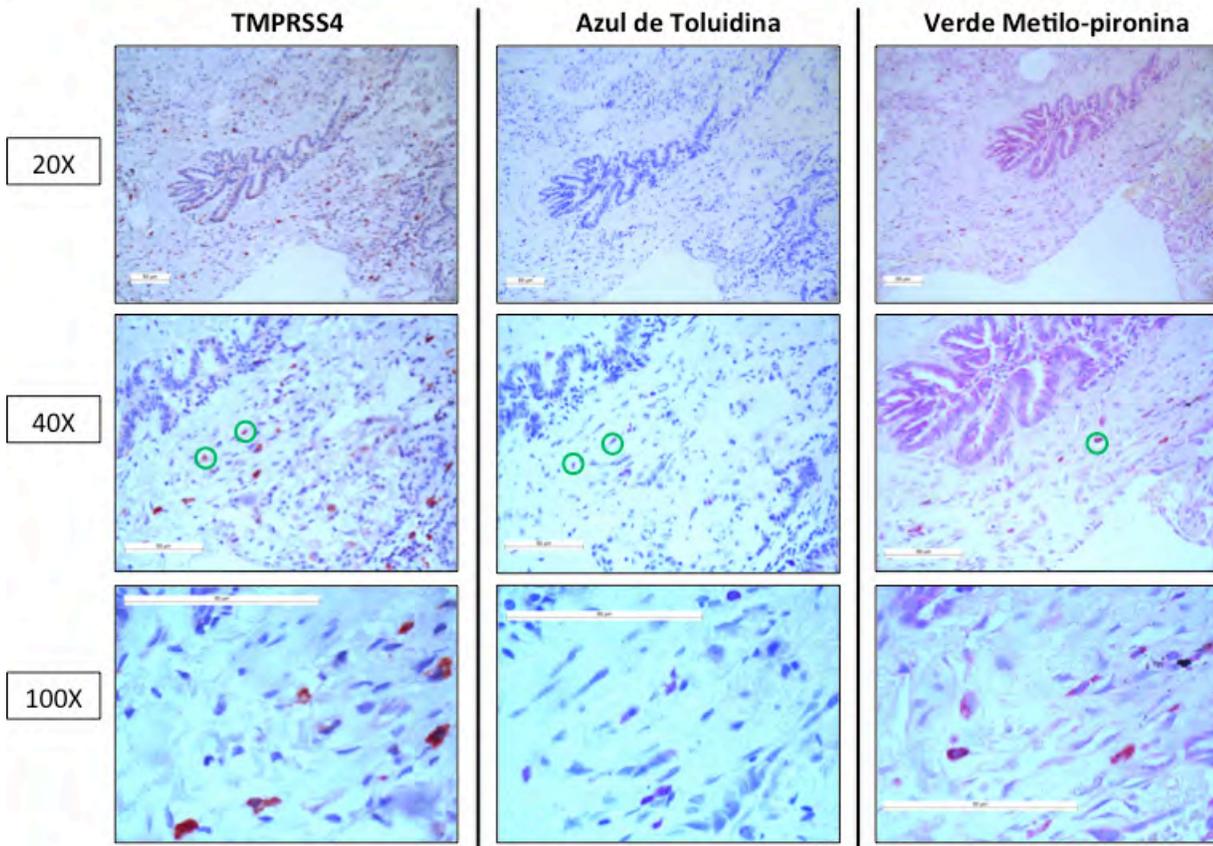
### TMPRSS4 se expresa principalmente en células epiteliales y cebadas

La localización celular de TMPRSS4 fue analizada mediante inmunohistoquímica en cortes de pulmón. Acorde con los resultados de expresión génica, no se observó proteína inmunorreactiva en los tejidos control. Por el contrario, los tejidos con FPI mostraron una fuerte marca positiva en células intersticiales. También se observó señal positiva en células epiteliales alveolares, aunque ésta fue más débil (**Figura 8**). La expresión de TMPRSS4 se observó principalmente en zonas fibróticas y no se detectó tinción positiva en fibroblastos.

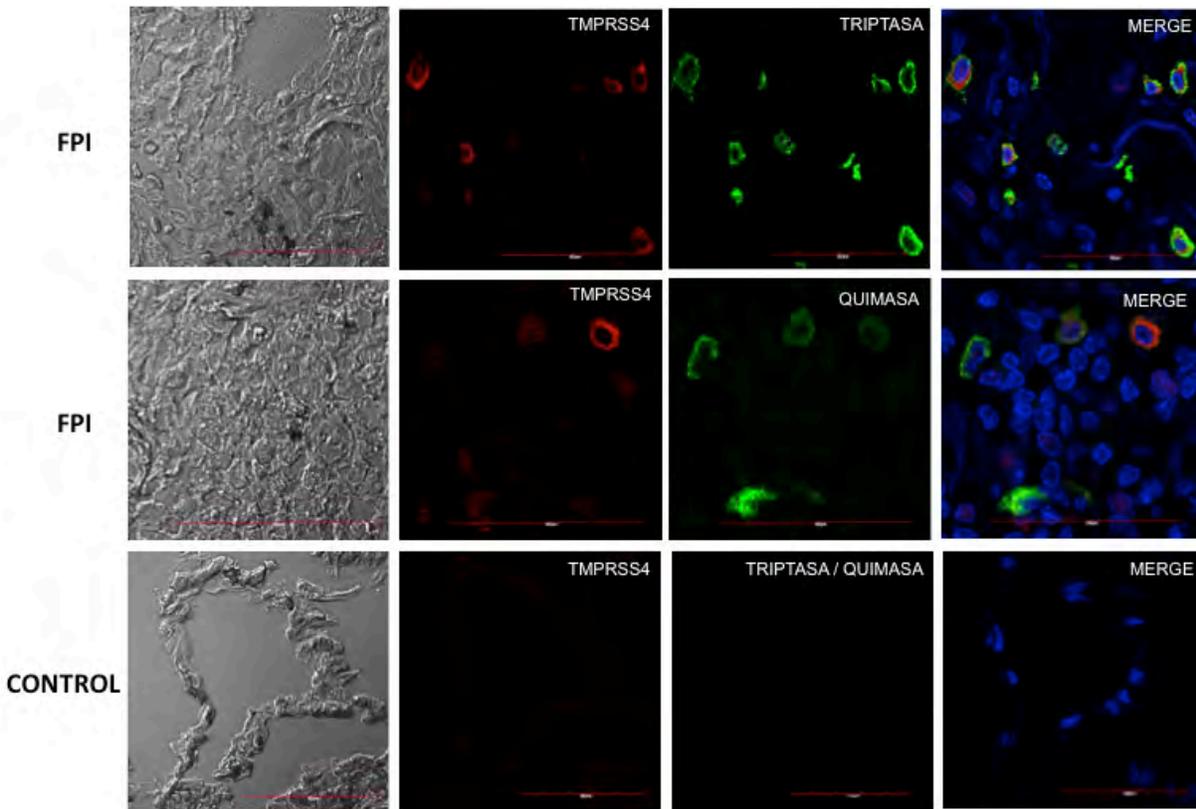


**Figura 8. Inmunolocalización de TMPRSS4 en pulmones con FPI y controles.** Fotomicrografías representativas de la tinción inmunohistoquímica realizada en secciones de pulmón con un anticuerpo específico contra TMPRSS4. Se observa tinción positiva en células epiteliales (páneles A y B) y en células intersticiales (panel C) de pulmones con FPI (n=5), mientras que no se advirtió marcaje positivo en pulmones normales (n=3) (panel D). El panel E muestra el control negativo donde el anticuerpo específico fue omitido. Todos los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina. Las flechas indican células positivas.

Como una primera aproximación para identificar el tipo de células intersticiales con marca positiva, y con la sospecha de que podrían ser células cebadas, se realizaron cortes secuenciales de una misma biopsia de pulmón con FPI y se tiñeron con un anticuerpo específico contra TMPRSS4 y con azul de toluidina o verde metilo-pironina. Los resultados sugirieron que, como presumíamos, las células intersticiales positivas para TMPRSS4 podrían ser células cebadas (**Figura 9**). Estos hallazgos fueron corroborados co-localizando TMPRSS4 con triptasa y quimasa, dos proteasas en el contenido granular de las células cebadas que comúnmente son empleadas como marcadores de dichas células. El análisis de las muestras por microscopía confocal reveló la co-localización de TMPRSS4 con ambas enzimas en las muestras provenientes de individuos con FPI (**Figura 10**).



**Figura 9. Identificación de células intersticiales con verde metilo-pironina y azul de toluidina.** Fotomicrografías representativas de cortes secuenciales de un pulmón con FPI, teñidas con un anticuerpo específico para TMPRSS4 y verde metilo-pironina o azul de toluidina. Se observa marca positiva para TMPRSS4 que aparentemente co-localiza con azul de toluidina, sugiriendo que las células intersticiales observadas podrían ser células cebadas. Las flechas indican células positivas.

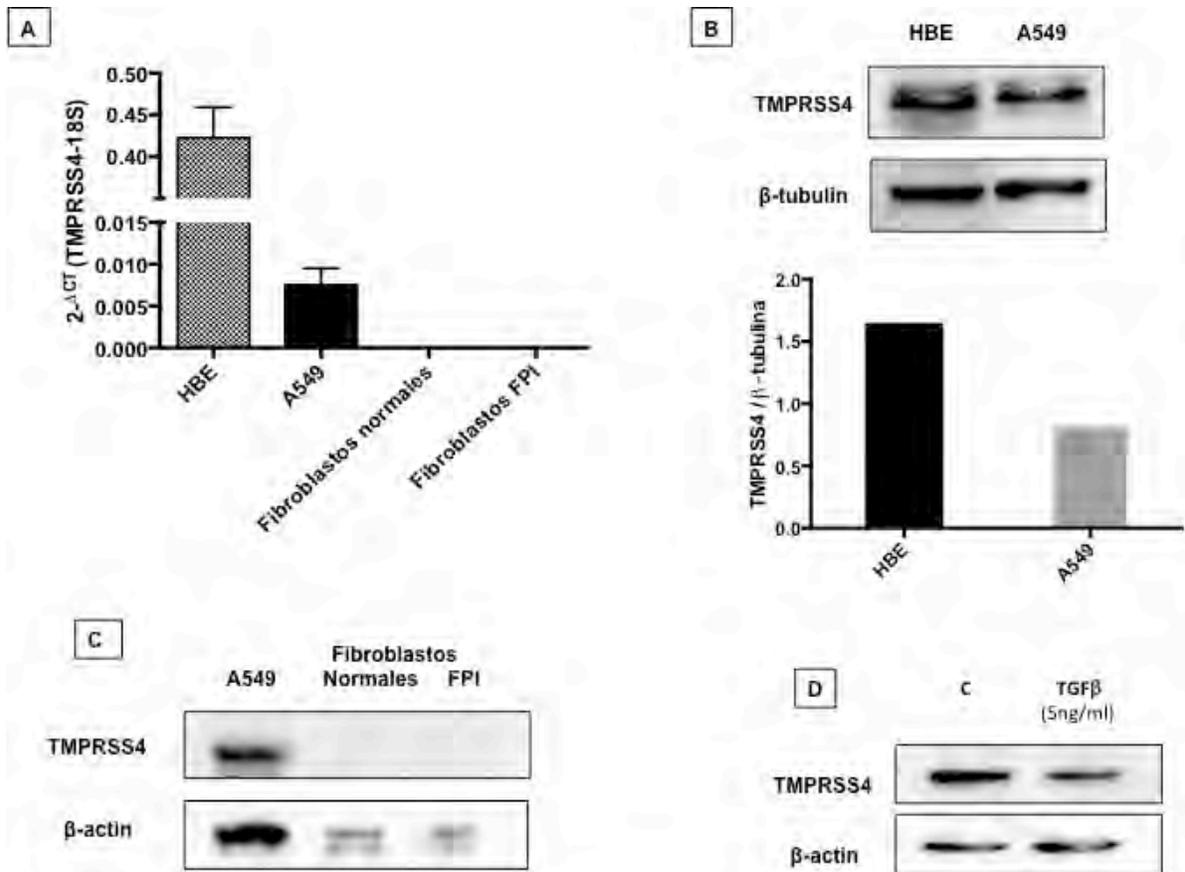


**Figura 10. Co-localización de TMPRSS4, triptasa y quimasa en pulmones con FPI y control.** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia realizada con anticuerpos específicos contra cada molécula en cortes de pulmón de pacientes con FPI. Fila Superior y central: pulmones con FPI co-expresando TMPRSS4 y triptasa o quimasa; fila inferior: pulmón normal (control) que no muestra expresión de las proteasas. Los tejidos fueron teñidos con diferentes fluorocromos: TMPRSS4 (Dylight-549, rojo), triptasa (AF-488, verde en panel superior) y quimasa (AF-647, verde en panel central). La co-localización de TMPRSS4 y triptasa o quimasa fue determinada por microscopía de fluorescencia y las imágenes se fusionaron para determinar la co-localización de dichas proteínas.

**TMPRSS4 se expresa en células epiteliales alveolares y bronquiales *in vitro* pero no en fibroblastos.**

Para corroborar los resultados de la inmunohistoquímica, se midió la expresión génica y los niveles de proteína de TMPRSS4 en fibroblastos de pulmones humanos normales y de FPI así como en dos líneas celulares epiteliales, una de origen alveolar (A549) y otra de origen bronquial (HBE). Como se muestra en la **Figura 11**, los fibroblastos ya fuesen de pulmones normales o derivados de FPI no expresaron TMPRSS4, (**Figura 11A y C**), mientras que ambas líneas de células epiteliales sí lo hicieron, tanto a nivel de mRNA como de proteína (**Figura 11A y B**).

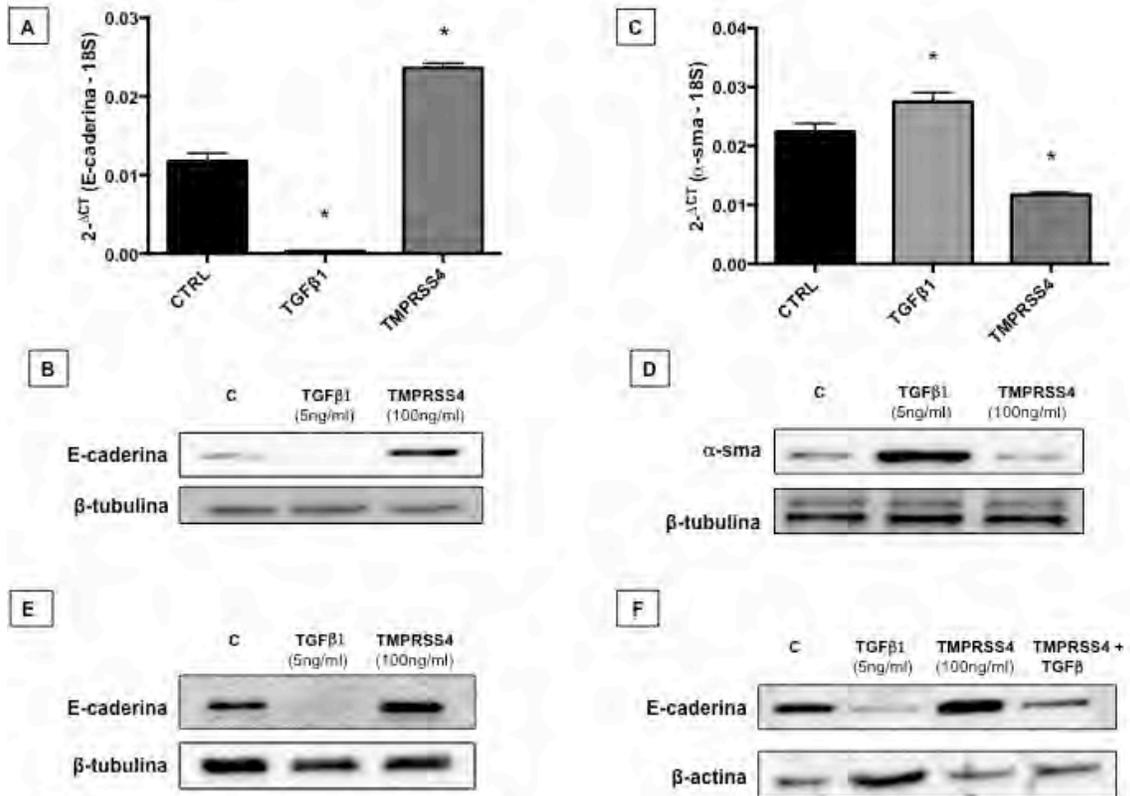
Además, se exploró el efecto de TGF- $\beta$ 1 en la expresión de TMPRSS4 en células A549, observándose una disminución de la proteasa a 96 horas después del estímulo (**Figura 11D**).



**Figura 11. TMPRSS4 se expresa en células epiteliales alveolares y bronquiales.** Panel A: La expresión génica de TMPRSS4 fue cuantificada por PCR en tiempo real en células epiteliales de las líneas A549 y HBE4-E6/E7 y en fibroblastos pulmonares de FPI (n=3) y normales (n=3). Se observa expresión en ambas líneas epiteliales pero no en fibroblastos. Panel B: la expresión de TMPRSS4 a nivel de proteína fue confirmada por Western blot en las células epiteliales. Panel C: Western blot representativo en fibroblastos pulmonares normales y fibróticos. Se usaron células A549 como control positivo. Panel D: Western blot en células A549 estimuladas con TGF $\beta$ 1 por 96 horas.

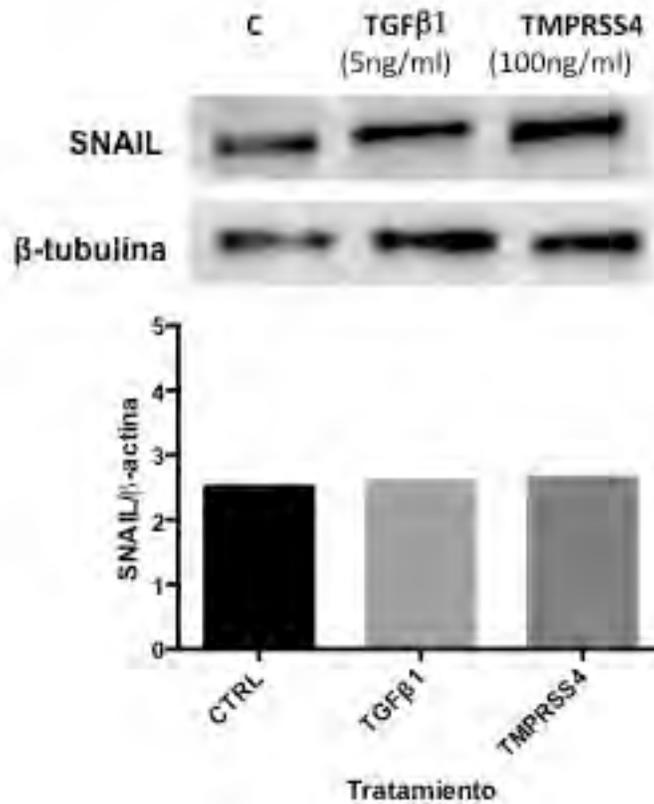
### **TMPRSS4 promueve aumento en la expresión de E-caderina en células epiteliales.**

Evidencia previa sugiere que TMPRSS4 promueve la transición epitelio mesénquima (TEM). Dado que dicho proceso ha sido implicado en la patogénesis de la FPI, examinamos cómo TMPRSS4 podría inducir TEM en células epiteliales. Para tal efecto se analizaron los niveles E-caderina y  $\alpha$ -SMA en células epiteliales alveolares control y estimuladas con la proteína recombinante de TMPRSS4 (100 ng/mL). Inesperadamente, TMPRSS4 incrementó la expresión de E-caderina a nivel de mRNA y proteína (**Fig. 12A y B**). Del mismo modo, TMPRSS4 redujo la expresión génica de  $\alpha$ -SMA por RT-PCR (**Figura 12C**) pero arrojó resultados variables a nivel de proteína en los cuales no se observaron cambios o se pudo apreciar una disminución (**Figura 12D**). El incremento en los niveles de E-caderina inducido por TMPRSS4 fue confirmado en células epiteliales alveolares de rata (RLE-6TN) (**Figura 12E**). Dado que la activación de la cascada de señalización de TGF- $\beta$ 1 promueve la transición epitelio mesénquima (TEM), un proceso que incluye una disminución en la expresión de E-caderina, quisimos evaluar el impacto de TMPRSS4 en tal proceso. Así, se trataron células A549 con TGF- $\beta$ 1 solo, TGF- $\beta$ 1 + TMPRSS4 o TMPRSS4 solo, y se analizó la expresión de E-caderina a los 4 días de estímulo por Western blot. Como se muestra en la **Figura 12F**, TMPRSS4 inhibió parcialmente la marcada disminución de E-caderina inducida por TGF- $\beta$ 1, apoyando el efecto de esta proteasa transmembranal tipo II en la adhesión celular.



**Figura 12. TMPRSS4 incrementa la expresión de E-cadherina.** Células epiteliales alveolares humanas (A549) fueron estimuladas con TMPRSS4 (100ng/mL) o TGF-β1 (5 ng/mL) y se determinó la expresión de E-cadherina y α-SMA por RT-PCR cuantitativa y Western blot. Panel A y C: TMPRSS4 incrementa de manera significativa los niveles de RNAm de E-cadherina y disminuye el RNAm de α-SMA comparado con las muestras control (\*p<0.01). Los datos fueron normalizados con los niveles del RNAr 18S. Panel B y D: Se extrajo la proteína total de las células estimuladas y se realizó un Western blot con anticuerpos específicos para E-cadherina y α-SMA. Células estimuladas con TGF-β1 fueron usadas como control positivo para TEM. Panel E: Células epiteliales alveolares de rata fueron estimuladas con TMPRSS4 (100 ng/mL) o TGF-β1 (5ng/mL) durante 4 días. Los Western blots son representativos de tres experimentos independientes. Panel F: Análisis por Western blot de células A549 control y estimuladas con TGFβ1, TMPRSS4 o TGFβ1 más TMPRSS4.

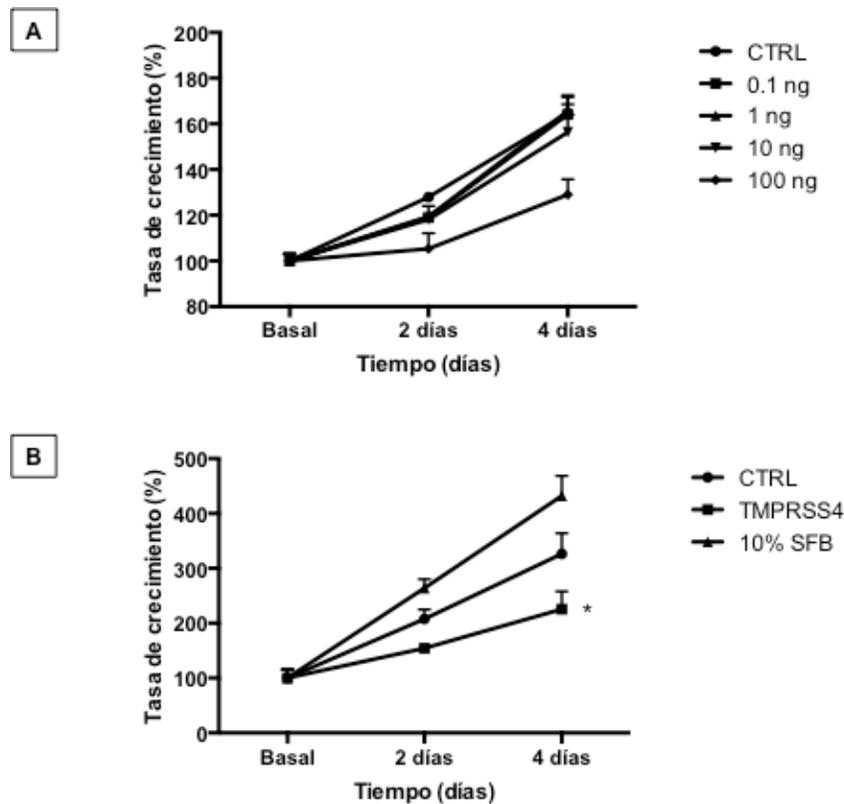
Acorde con los resultados anteriores, no se observaron cambios en la expresión de SNAIL (**Figura 13**), una molécula que es activada por TGF $\beta$ 1 y que desempeña una papel central en la regulación de la TEM debido a su capacidad para reprimir la expresión del gen de E-caderina.



**Figura 13. TMPRSS4 no modifica la expresión de SNAIL.** Células epiteliales alveolares A549 fueron estimuladas con TMPRSS4 (100 ng/mL) o TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) durante 4 días y se cuantificó la expresión de SNAIL por Western blot. La gráfica muestra los resultados de la densitometría. La imagen es representativa de dos experimentos independientes.

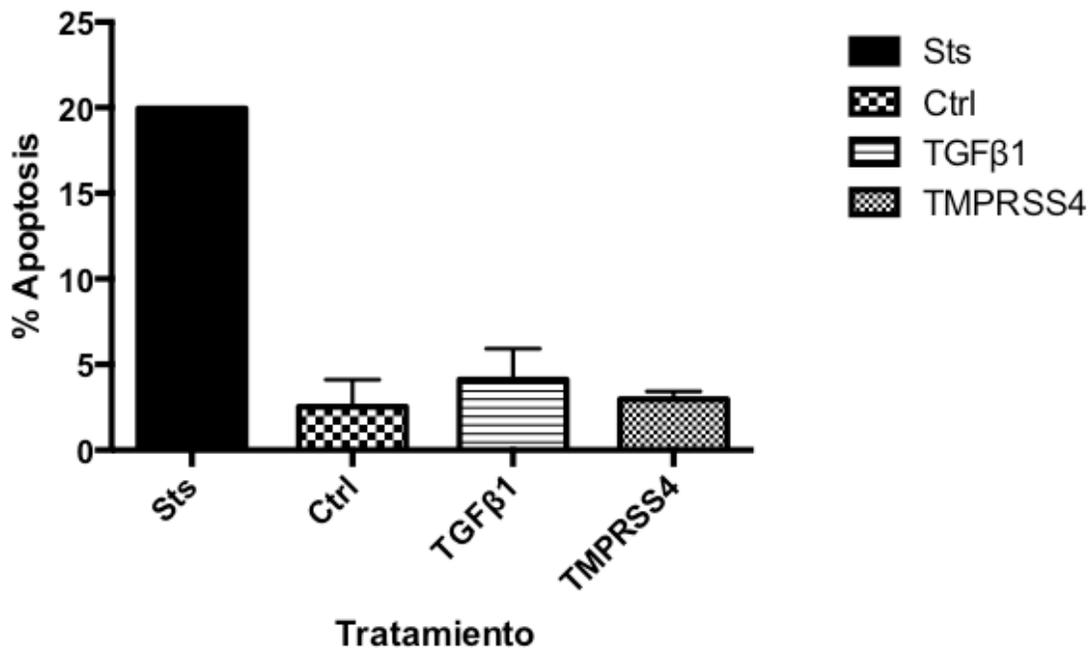
## TMPRSS4 reduce la tasa de crecimiento en células epiteliales alveolares y no induce apoptosis

El estímulo de la proteína recombinante de TMPRSS4 sobre células epiteliales alveolares de la línea A549 indujo una disminución en la tasa de crecimiento, medida por el ensayo de viabilidad celular WST-1. El análisis de la curva dosis-respuesta mostró que el efecto inhibitorio de TMPRSS4 depende de su concentración, alcanzando un efecto significativo a 100 ng/mL 4 días después de iniciado el estímulo (**Figura 14A y 14B**).



**Figura 14. TMPRSS4 reduce la tasa de crecimiento en células epiteliales alveolares.** Panel A: Se cultivaron células epiteliales alveolares de la línea A549 en cajas de 48 pozos, en medio sin SFB y se estimularon con TMPRSS4 (0.1, 1, 10 y 100 ng/mL). Panel B: El experimento se repitió con 100 ng/mL en dos experimentos independientes. La tasa de crecimiento fue estimada con el ensayo de WST-1 a los 4 días luego del estímulo. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de un experimento representativo realizado por triplicado. \* $p < 0.05$ .

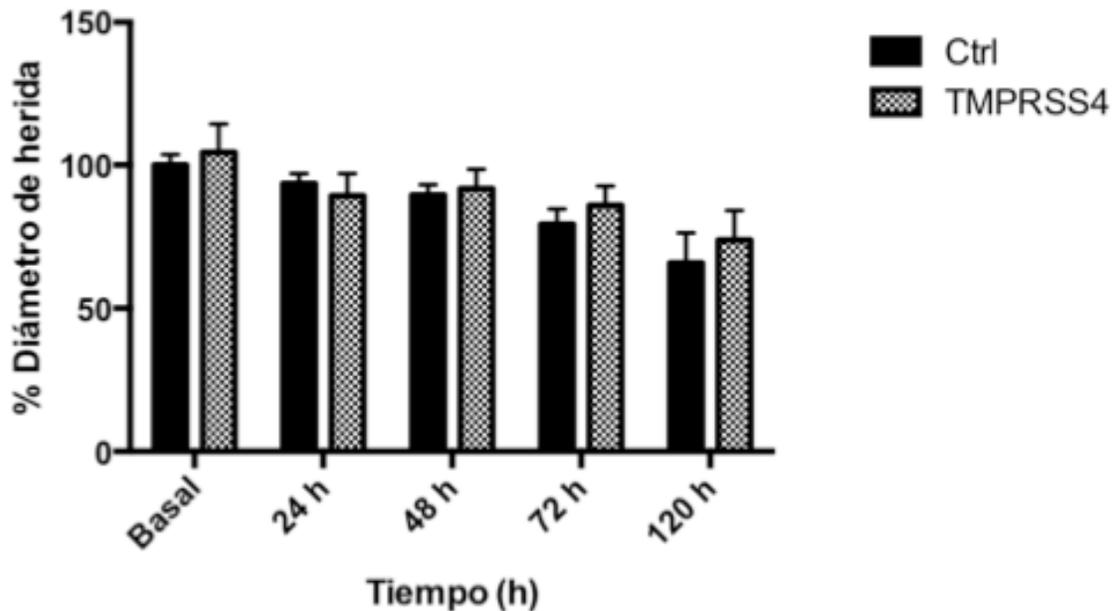
Adicionalmente, se analizó si la reducción observada en el número celular podía deberse a la inducción de un proceso apoptótico luego del estímulo con TMPRSS4. Como control positivo se utilizó estaurosporina (Sts), un conocido inductor de apoptosis. Los resultados mostraron los mismos niveles de apoptosis en las células tratadas con la proteína recombinante que aquellos observados en las células que no recibieron el estímulo (**Figura 15**).



**Figura 15. TMPRSS4 no induce apoptosis en células epiteliales alveolares.** Se cultivaron células epiteliales alveolares de la línea A549 en cajas de 6 pozos, en medio sin SFB y se estimularon con TMPRSS4 (100 ng/mL). El porcentaje de apoptosis fue evaluado por el ensayo de Anexina V a los 4 días luego del estímulo. Se usó estaurosporina (Sts) como control positivo. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de dos experimentos realizados por triplicado.

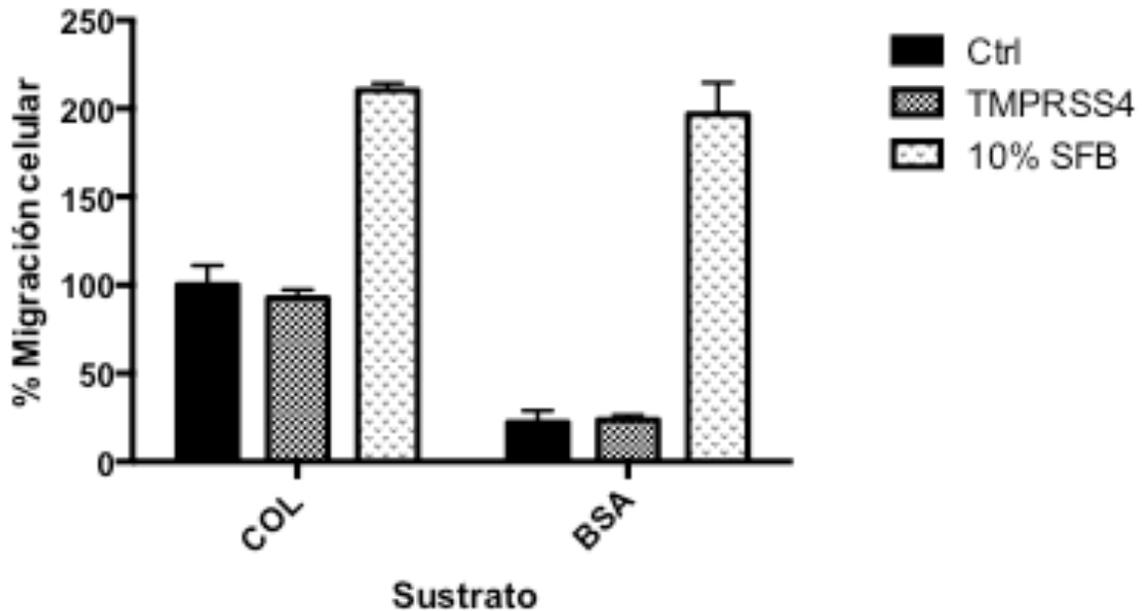
## TMPRSS4 no modifica la migración de células epiteliales alveolares

Evidencia previa sugiere que TMPRSS4 induce la migración celular en diversos tipos de cánceres. Con el fin de determinar si esto ocurre en el pulmón, se estimularon células epiteliales alveolares A549 con TMPRSS4 (100 ng/mL) durante 24, 48, 72 y 120 horas. Inicialmente, la migración fue evaluada mediante el ensayo de cierre de herida. No se observaron diferencias significativas entre las células control y las tratadas con TMPRSS4 a ninguno de los tiempos (Figura 16).



**Figura 16. TMPRSS4 no induce migración en células epiteliales alveolares.** Se cultivaron células epiteliales alveolares de la línea A549 en medio sin SFB y se estimularon con TMPRSS4 (100 ng/mL) durante diversos tiempos. La migración fue evaluada por el ensayo de cierre de la herida. La cuantificación del cierre de la herida no muestra cambios en las células estimuladas con TMPRSS4 al comparar con el control. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres experimentos realizados por triplicado.

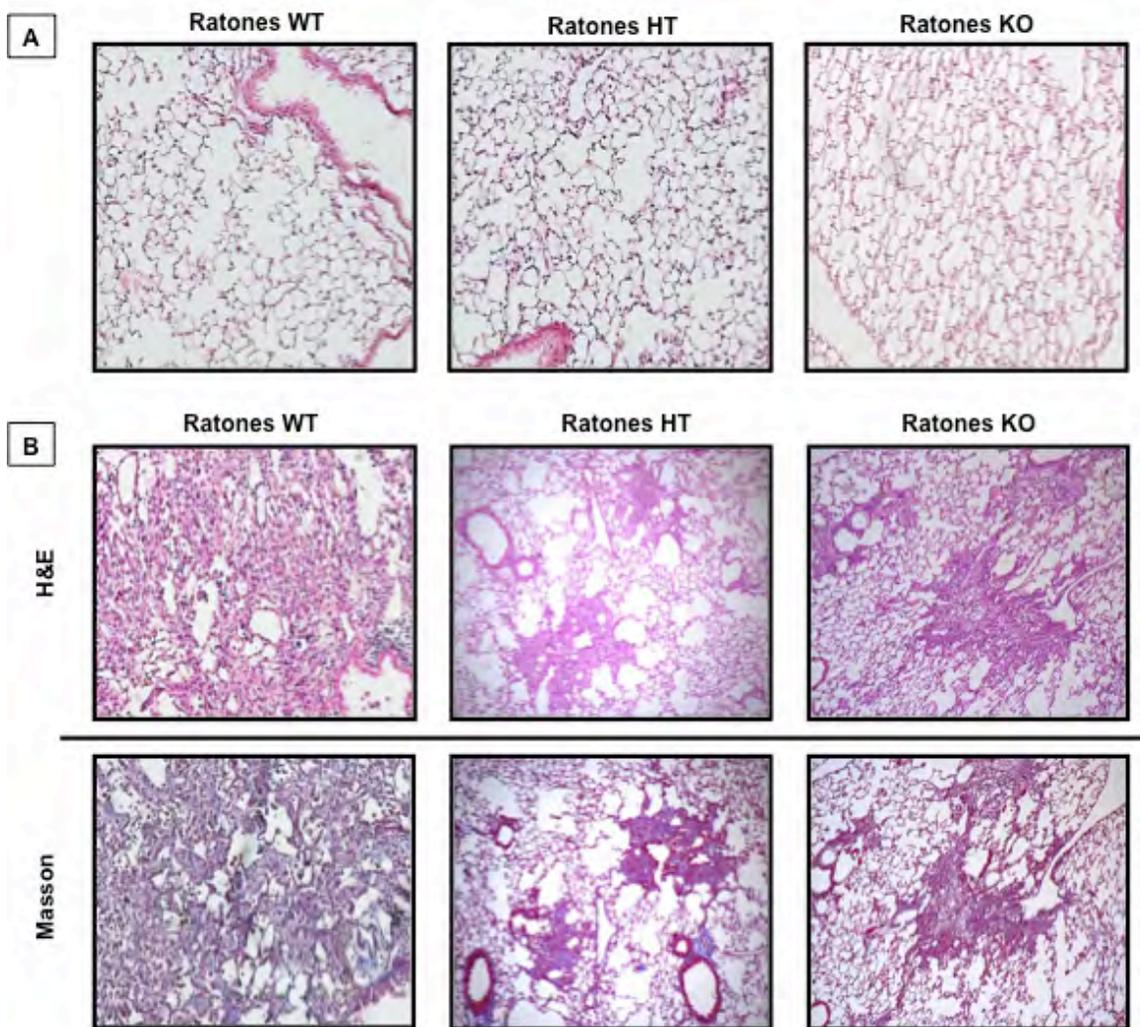
Los resultados obtenidos con el análisis de cierre de la herida fueron corroborados mediante un ensayo de migración en cámaras de Boyden cubiertas con colágena tipo I. Nuevamente, células A549 fueron estimuladas con TMPRSS4 (100 ng/mL) durante 96 horas y se compararon contra células sin estimular. Como control positivo se empleó SFB al 10%, el cual contiene diversos factores que podrían promover la migración de las células (**Figura 17**). Los resultados obtenidos mediante este ensayo, son similares a los de cierre de heridas, mostrando que no hay cambios en la migración de las CEAs al estimular con TMPRSS4.



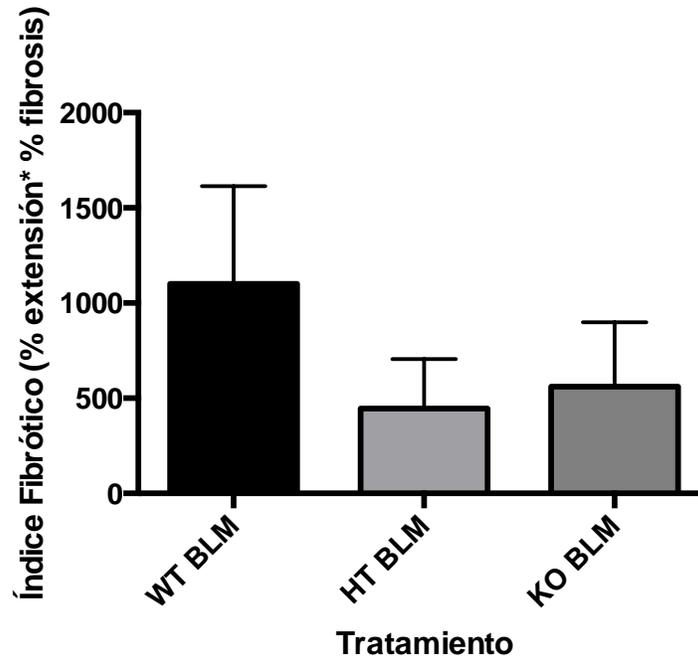
**Figura 17. TMPRSS4 no induce migración en células epiteliales alveolares.** Se cultivaron células epiteliales alveolares de la línea A549 en medio sin SFB y se estimularon con TMPRSS4 (100 ng/mL) por 96 h. La migración se cuantificó usando cámaras de Boyden cubiertas con colágena tipo I o BSA como control. Se presenta el porcentaje de migración celular usando SFB como control positivo. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de un experimento realizado por triplicado.

### **La deficiencia de TMPRSS4 atenúa la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en ratón.**

Para definir el efecto de TMPRSS4 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, se instilaron ratones silvestres (WT), heterocigotos (HT+/-) y deficientes (KO-/-) de TMPRSS4 con una sola dosis intratraqueal de bleomicina (7U/kg) o solución salina y se sacrificaron a los 28 días. La respuesta fibrótica fue examinada por morfología pulmonar y la concentración de hidroxiprolina como una medida indirecta del contenido de proteína colágena. La evaluación histopatológica mostró una fibrosis severa en los animales silvestres tratados con bleomicina, la cual fue marcadamente reducida en los ratones deficientes y haploinsuficientes (**Figura 18**). Como se observa en la **Figura 19**, el índice fibrótico morfológico disminuyó significativamente en los animales KO ( $560.7 \pm 338.4$ ) y HT ( $446.5 \pm 259.7$ ) en comparación con los animales WT ( $1100.0 \pm 514.24$ ) ( $p < 0.01$ ).

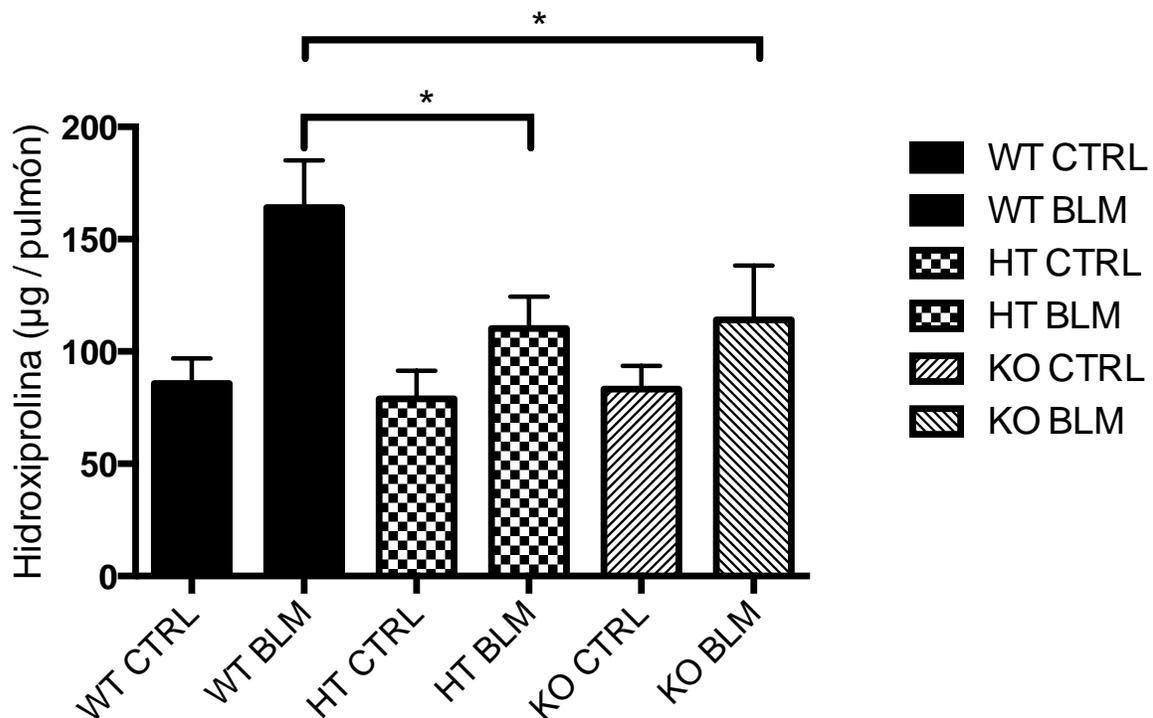


**Figura 18. La deficiencia de *TMPRSS4* atenúa el daño pulmonar inducido con bleomicina en ratón.** Ratones silvestres (WT), haplodeficientes (HT) y deficientes (KO) de *TMPRSS4* fueron instilados intratraquealmente con bleomicina (7 U/kg) o solución salina y se estudiaron a los 28 días post-instilación. Panel A: Ratones control instilados con solución salina. Panel B: Ratones con fibrosis pulmonar inducida con bleomicina. El análisis histopatológico se realizó tiñendo con hematoxilina y con tricrómica de Masson.



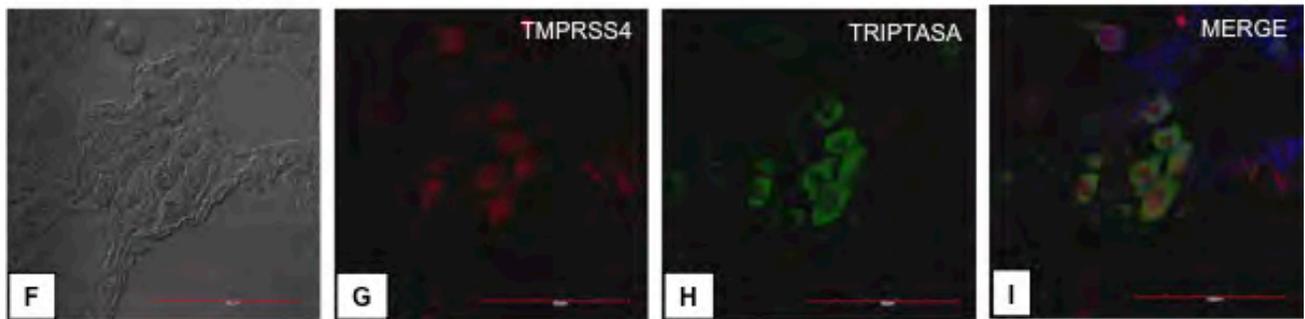
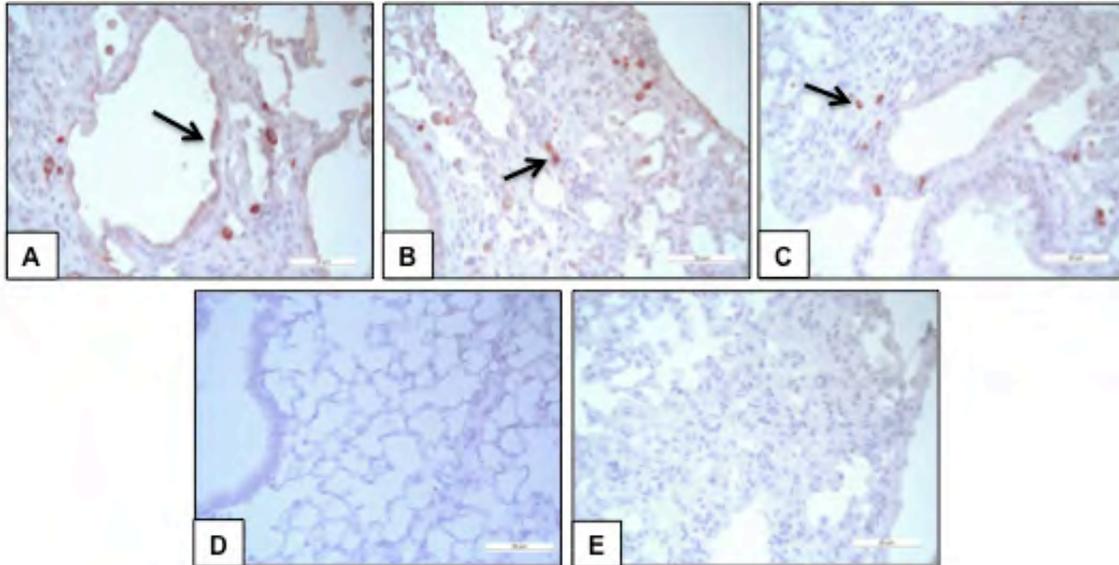
**Figura 19.** La deficiencia de *TMPRSS4* disminuye el índice fibrótico en ratones tratados con bleomicina. Ratones silvestres (WT), haplodeficientes (HT) y deficientes (KO) de *TMPRSS4* fueron instilados intratraquealmente con bleomicina (7 U/kg) o solución salina y se estudiaron a los 28 días post-instilación. El índice fibrótico se calculó multiplicando el porcentaje de extensión de la lesión por el porcentaje de fibrosis observado. Resultados como promedio  $\pm$  DS.

Posteriormente se determinó, con el ensayo de cuantificación de hidroxiprolina, el contenido de colágena en el pulmón izquierdo completo. En condiciones basales, no se encontraron diferencias en el contenido de hidroxiprolina. Por el contrario, a los 28 días post-instilación con bleomicina, se observó un incremento sustancial en la concentración de colágena en los ratones WT el cual se redujo de manera significativa en los ratones deficientes de *TMPRSS4* (+/-) y (-/-) (WT:  $164 \pm 21.1$   $\mu$ g OH-Pro/pulmón versus HT:  $110.2 \pm 14.3$   $\mu$ g OH-Pro/pulmón y KO:  $114.1 \pm 24.2$   $\mu$ g OH-Pro/pulmón respectivamente;  $p < 0.01$ ) (**Figura 20**). No se encontraron diferencias entre ratones haploinsuficientes y deficientes.



**Figura 20. La deficiencia de *TMPRSS4* reduce la acumulación de colágena pulmonar en la fibrosis inducida por bleomicina.** Ratones silvestres (WT), haplodeficientes (HT) y deficientes (KO) fueron instilados con bleomicina (7 U/kg) y estudiados a los 28 días. El contenido de colágena fue cuantificado por el ensayo de hidroxiprolina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DS de entre 7-12 animales por grupo. \* $p < 0.01$  comparado con animales WT instilados.

Al igual que como se observó en pulmones de pacientes con FPI, *TMPRSS4* es expresada por células epiteliales y más intensamente por células intersticiales en ratones WT (**Figura 21A-E**). La inmunocolocalización con triptasa demostró que dichas células intersticiales son células cebadas (**Figura 21F-I**).



**Figura 21. *TMPRSS4* se expresa en células epiteliales y cebadas en el modelo de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina.** Fotomicrografías representativas de la tinción inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo específico contra *TMPRSS4* en cortes de pulmón de ratones *WT* provenientes del modelo de daño pulmonar con bleomicina. La enzima inmunoreactiva se observó en células epiteliales (panel A, flecha negra) e intersticiales (panel B y C, flechas negras). Panel D: No se detectó tinción positiva en pulmones normales. Panel E: Muestra el control negativo en donde el anticuerpo específico fue reemplazado por suero. Todos los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina. Panel F-I: Imágenes representativas de la inmunofluorescencia realizada con anticuerpos específicos contra *TMPRSS4* y triptasa; los tejidos fueron teñidos con Dylight-549 (rojo) para *TMPRSS4* y con AF-488 (verde) para triptasa. La co-localización de *TMPRSS4* y triptasa se determinó por microscopía de fluorescencia y las imágenes fueron fusionadas para resolver la co-localización entre las dos proteínas.

## DISCUSIÓN

La FPI es una enfermedad progresiva y usualmente letal de etiología desconocida y patogénesis incierta. En los últimos años, algunas metaloproteasas han sido implicadas en su patogénesis no sólo a través de la remodelación de la matriz extracelular sino también en la activación de diferentes mediadores profibróticos contribuyendo al comportamiento alterado de diferentes células pulmonares [35, 36, 82-84]. Sin embargo, los estudios con otras proteasas son escasos.

Las serin-proteasas transmembranales de tipo II comprenden 4 subfamilias: a) Matriptasa, b) Hepsina/serin-proteasa transmembranal (TMPRSS), c) HAT/DESC y d) corina [85]. Recientemente, se ha mostrado que la expresión y la actividad de la matriptasa está incrementada en FPI, afectando principalmente el comportamiento de los fibroblastos y promoviendo su activación, proliferación y migración [86]. De hecho, el análisis de expresión de la proteína mostró que los fibroblastos pulmonares primarios derivados de tejidos con FPI producían prácticamente el doble de la enzima en comparación con fibroblastos obtenidos de pulmones normales. De manera importante, esta investigación también mostró que la inhibición de la matriptasa atenúa la fibrogénesis pulmonar *in vivo*.

En el presente estudio, evaluamos un miembro de la subfamilia de la Hepsina, TMPRSS4, que en contraste con la matriptasa permanece como una proteína huérfana en el sentido de que, hasta la fecha, no se conocen sus sustratos, y sus funciones apenas empiezan a ser elucidadas [87]. La mayoría de los estudios existentes se han enfocado en sus implicaciones en diferentes tipos de cánceres, aportando evidencia creciente que indica que la sobreexpresión de TMPRSS4, entre otros efectos, promueve procesos tipo transición epitelio mesénquima e induce la migración celular [88], dos eventos que han sido descritos en la FPI [11, 89, 90]. Los estudios en enfermedades no neoplásicas son escasos pero se ha mostrado que TMPRSS4 podría contribuir a la

replicación y propagación del virus de la influenza, y que una mutación en esta proteína causa un desorden pediátrico neurodegenerativo de reciente descubrimiento, llamado síndrome de atrofia cerebral recesiva autosómica (ARCA) [55, 91].

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio realizado con TMPRSS4 en un desorden de tipo fibrótico. Primero, exploramos la expresión génica y la posible localización celular de esta molécula en pulmones con FPI y encontramos que TMPRSS4 está sobre-expresada, encontrándose principalmente en células cebadas y células epiteliales alveolares en las zonas fibróticas del pulmón, pero no se encontró en células mesenquimatosas que forman los característicos focos de fibroblastos/miofibroblastos. *In vitro*, corroboramos que TMPRSS4 se expresa en células epiteliales bronquiales y alveolares y, de manera importante, estuvo ausente en fibroblastos pulmonares tanto normales como provenientes de FPI, contrario a lo que se ha reportado con la matriptasa. Estos resultados sugieren que estas dos serín-proteasas promueven el desarrollo de la fibrosis afectando el comportamiento de diferentes tipos celulares.

Tomando en consideración que las células epiteliales alveolares desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de la FPI, decidimos enfocarnos sobre estas células *in vitro*. Sorprendentemente, el estímulo de células epiteliales alveolares con TMPRSS4 provocó un incremento significativo de la expresión de E-caderina, un hallazgo que fue corroborado en células epiteliales alveolares obtenidas de ratas. E-caderina, la principal caderina en células epiteliales, es una molécula de adhesión celular importante que media las uniones estrechas (*tight junctions*) entre células epiteliales. Esta molécula es crítica en el mantenimiento de la integridad estructural de los tejidos y, entre otras funciones, inhibe la proliferación celular [92]. Acorde con este concepto, nuestro estudio demostró una disminución significativa de la tasa de crecimiento cuando las células epiteliales pulmonares fueron estimuladas con la proteína recombinante

de TMPRSS4. En cambio, no se encontraron cambios en el porcentaje de apoptosis o la migración de células epiteliales alveolares A549.

En concordancia con este hallazgo, nuestros resultados indican que TMPRSS4 inhibe, al menos en las células epiteliales alveolares de pulmón, la TEM inducida por TGF $\beta$ 1. La TEM es un proceso que ha sido asociado con la expansión de la población de fibroblastos y la subsecuente fibrosis. Sin embargo, la TEM no siempre es una respuesta de “todo o nada” sino que muestra un espectro de fases intermedias y puede inducir un fenotipo intermedio conocido como estado de TEM parcial. En el estado de TEM parcial, algunas células continúan mostrando morfología y marcadores moleculares específicos de células epiteliales, como citoqueratina y E-caderina, pero presentan expresión concomitante de marcadores mesenquimales como FSP-1 (*fibroblast-specific protein 1*, también conocida como S100A4 y MTS-1) y  $\alpha$ -SMA [15]. Eventualmente, estas células pueden dejar la capa epitelial, se abren camino a través de la membrana basal subyacente y se acumulan en el intersticio del tejido [93], donde finalmente pierden todos sus marcadores epiteliales y obtienen un fenotipo completamente fibroblástico. De manera importante, la TEM parcial es un proceso importante para la regeneración tisular normal ya que facilita la migración colectiva eficiente del epitelio cohesivo, manteniendo su organización interna y acelerando de esta forma la cicatrización de heridas [94]. Por ejemplo, la TEM parcial ocurre en la cicatrización de heridas epidérmicas en adultos para facilitar la migración de queratinocitos durante la reepitelización, acelerando así el cierre de la herida. Del mismo modo, las células bronquiolares en las vías aéreas siguen un programa de TEM transitoria durante la regeneración del epitelio bronquiolar [94]. En este contexto, mediante la inhibición de la inducción de una TEM parcial y de la consecuente migración de células epiteliales, TMPRSS4 podría estar contribuyendo a la remodelación tisular anormal fibrótica después del daño pulmonar.

Por otra parte, algunos factores de transcripción facilitan la adquisición de un fenotipo mesenquimal, tal es el caso de Snail y Slug. Estos factores son inducidos por la exposición a TGF $\beta$ 1 y, una vez expresados, reprimen la expresión de E-caderina [95]. Así, la expresión de E-caderina y Snail correlacionan de manera inversa. En nuestro estudio, el aumento en los niveles de E-caderina se vio acompañado de cambios nulos en la expresión de Snail, ya sea al estimular con TGF $\beta$ 1 o con TMPRSS4, sugiriendo una ruta de regulación de E-caderina independiente a ésta. Finalmente, también observamos que TGF $\beta$ 1 disminuye la expresión de TMPRSS4, sugiriendo una regulación negativa de este mediador.

Para determinar si TMPRSS4 está implicada en el desarrollo de la fibrosis pulmonar experimental, se trataron ratones silvestres (+/+), haplodeficientes (+/-) y deficientes (-/-) de TMPRSS4 con bleomicina y se midió la respuesta fibrótica observando la morfología y el contenido de colágena en los pulmones. Nuestros resultados revelaron un papel importante de TMPRSS4 en la promoción de la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina ya que mientras que en los animales WT se presentó una grave respuesta fibrótica, en los ratones deficientes sólo hubo un modesto incremento en el depósito de colágena y se conservó la arquitectura pulmonar luego de la administración de bleomicina. De manera interesante, no observamos una respuesta dosis-efecto a nivel génico, esto es, los ratones completamente deficientes y haploinsuficientes respondieron de manera similar. En este contexto, existen múltiples ejemplos en la literatura que muestran que en algunos casos esto puede ocurrir indicando un efecto dominante de la haploinsuficiencia [96, 97].

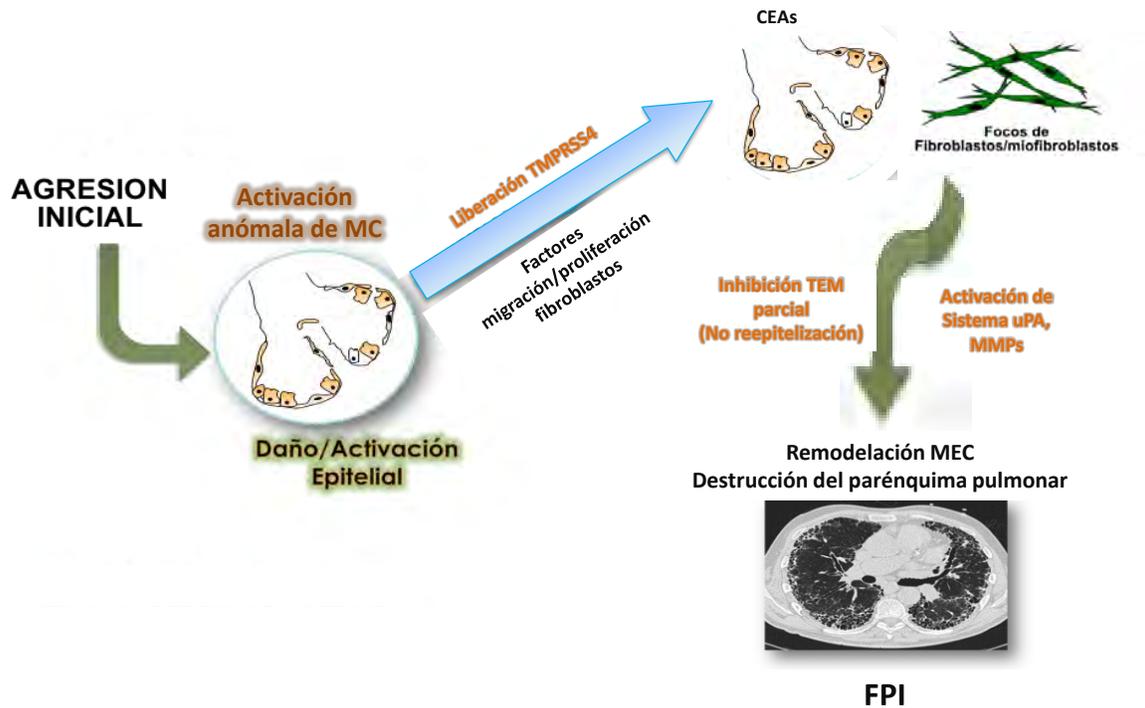
Por otro lado, y de manera similar a lo que ocurre en la FPI, en el modelo animal de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, TMPRSS4 se observó también en células epiteliales y de manera más marcada en células cebadas. No obstante, los mecanismos profibróticos que desempeña la TMPRSS4 producida por las células cebadas es incierto. Las células cebadas son granulocitos altamente

especializados que contribuyen a la respuesta inmune innata y adaptativa [98], así como a la reparación tisular y la revascularización [99-101]. Estas células realizan la mayoría de sus funciones liberando mediadores pleiotrópicos preformados y/o generados en respuesta a diversas señales de activación para desencadenar una respuesta inflamatoria programada. Están presentes en todos los tejidos vascularizados y son particularmente abundantes en los sitios mayormente expuestos al ambiente, como la piel, el tracto gastrointestinal y el aparato respiratorio. En muchos estados patológicos como el asma, la inflamación crónica puede deberse a una activación inapropiada de las células cebadas y/o a su redistribución en estructuras específicas que podrían conducir a procesos perjudiciales de remodelación tisular, contribuyendo así a la progresión de la enfermedad [102]. En FPI, las células cebadas generalmente se incrementan de manera marcada en las zonas fibróticas de los pulmones de los pacientes. En estas áreas, se encuentran activadas y localizadas en la proximidad de los focos de fibroblastos y de las células epiteliales alveolares tipo II en donde pueden liberar un gran número de mediadores, incluyendo una variedad de proteasas y citocinas que ejercen actividad profibrótica [103]. Las células cebadas pulmonares humanas tienen gránulos con diferente contenido de proteasas y han sido clasificadas como: células cebadas que contienen sólo triptasa ( $MC_T$ ), sólo quimasa ( $MC_C$ ) o ambas ( $MC_{TC}$ ). Estos subtipos pueden cambiar sus fenotipos de acuerdo con las modificaciones del microambiente [102]. También se ha observado que las células cebadas en la fibrosis pulmonar muestran signos de degranulación [104] y que su cocultivo con fibroblastos pulmonares humanos de pacientes con FPI las activa para liberar la triptasa [103]. Previamente, en nuestro laboratorio habíamos identificado un incremento en la expresión de  $TGF\beta_1$  principalmente en las  $MC_{TC}$  localizadas en las vías respiratorias pequeñas y el parénquima alveolar [105].

En el presente estudio, usando microscopía confocal, encontramos que los tres subtipos de células cebadas expresan Tmprss4 y, aunque en menor medida, también se encontró en células epiteliales pulmonares, las cuáles como se

mencionó son críticas para el desarrollo de la FPI [11]. En ratón se ha mostrado que, tras una lesión inflamatoria en el riñón, las células epiteliales se encuentran bajo la influencia de diversas moléculas y, actuando junto con las células inflamatorias, inducen el daño de la membrana basal y la degradación focal de la colágena tipo IV y la laminina [106]. Las células epiteliales delaminadas pueden migrar hacia el área intersticial bajo la influencia de gradientes de factores de crecimiento y otros factores quimiotácticos [106]. Este reclutamiento inicial de células epiteliales en una TEM se puede inhibir bloqueando la expresión de MMP-9 a través de la interrupción del activador del plasminógeno tisular (tPA) [107]. De manera importante, se ha observado que el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) está asociado a regiones de fibrosis en el pulmón fibrótico de los pacientes con FPI, y que ejerce actividad profibrogénica a través de la unión con su receptor [108]. En este sentido, otros estudios en cáncer, han sugerido que TMPRSS4 es un regulador río arriba de la activación del pro-uPA, mostrando que TMPRSS4 convierte directamente el pro-uPA inactivo en su forma activa a través de su actividad proteolítica [78]. Además, se ha observado que, en el pulmón, existe una correlación significativa entre los niveles de expresión de uPA y TMPRSS4, sugiriendo que esta proteasa es un regulador importante de la regulación génica de uPA [77]. Se ha descrito que uPA, junto con su receptor (uPAR) y las MMPs desempeñan como función principal la degradación de la matriz extracelular, aunque también resultan ser centrales en el desarrollo de células malignas durante la progresión tumoral y han sido implicados en la TEM asociada a cáncer [109]. El sistema uPA cataliza la producción de plasmina que media la activación de las MMPs, desempeñando un papel importante en la invasión y la metástasis en cáncer de mama a través de la remodelación de la MEC [110]. Aunque hasta el momento desconocemos el modo en que TMPRSS4 promueve el desarrollo de la FPI o modifica el comportamiento de las células cebadas, nuestros datos aunados a los estudios mencionados apoyan el concepto de que, posiblemente, la sobreexpresión de TMPRSS4 en las células cebadas del pulmón y su liberación a partir de la degranulación de las mismas, podría influenciar la actividad de las células epiteliales y contribuir a la activación

del sistema uPA y, en consecuencia, de las MMPs ejerciendo su efecto profibrótico a través de la remodelación de la MEC durante el desarrollo de la FPI.



**Figura 22. Esquematación de los eventos fibrogénicos propuestos en los que podría participar TMPRSS4 durante el desarrollo de la FPI.** El epitelio alveolar es lesionado por una causa desconocida. Las células epiteliales alveolares activas liberan factores que inducen la migración y proliferación de los fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. Las células cebadas (MCs) adyacentes a focos de fibroblastos y células epiteliales alveolares podrían cursar una activación inapropiada, liberando TMPRSS4 al degranularse. TMPRSS4 inhibe la proliferación y la TEM parcial en las CEAs, impidiendo así la reepitelización del pulmón. Además, TMPRSS4 induce la activación del sistema uPA y, con ello, la activación de las MMPs, favoreciendo así la remodelación de la MEC. Lo anterior aunado a los fibroblastos que secretan grandes cantidades de matriz extracelular, perpetúa el daño y conduce al desarrollo de la FPI. Imagen modificada de: Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory Research*. 2001; 3:3.

## **CONCLUSIONES**

El presente trabajo constituye una investigación novedosa en la que, por primera vez, se asocia la presencia de TMPRSS4 con el desarrollo de una enfermedad fibrótica. Nuestros resultados mostraron que esta proteasa, además de estar sobreexpresada en los pulmones provenientes de pacientes con FPI, disminuye su concentración plasmática respecto de lo observado en sujetos sanos. Sin embargo, no es posible utilizarla como marcador diagnóstico para FPI dado que no se encontraron diferencias significativas al comparar con otras neumopatías intersticiales difusas. TMPRSS4 no se expresa en fibroblastos pulmonares normales o fibróticos. Tanto en humano como en ratón, se observó una fuerte sobreexpresión de la proteasa en células cebadas y una expresión más modesta en células epiteliales pulmonares, dos tipos celulares que resultan críticos para el desarrollo de la FPI. Adicionalmente, la disminución en la respuesta fibrótica a bleomicina en ratones deficientes de TMPRSS4 sugiere un papel profibrótico de esta proteasa. Los mecanismos por los cuales actúa aún son desconocidos, por lo que se requiere de futuras investigaciones para esclarecerlos.

## LITERATURA CITADA

1. Selman, M., *Neumopatías Intersticiales Difusas*. 1997, México: Editorial Médica Panamericana.
2. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
3. Pardo, A. and M. Selman, *Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1743-61.
4. Kim, D.S., H.R. Collard, and T.E. King, Jr., *Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(4): p. 285-92.
5. Olson, A.L., et al., *Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(3): p. 277-84.
6. Scotton, C.J. and R.C. Chambers, *Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus*. Chest, 2007. **132**(4): p. 1311-21.
7. Garcia-Sancho, C. and e. al, *Risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis in a Mexican population. A case-control study*. Respir Med, 2010. **104**: p. 305-9.
8. Garcia-Sancho, C., et al., *Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis*. Respir Med, 2011. **105**(12): p. 1902-7.
9. Selman, M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. Ann Intern Med, 2001. **134**(2): p. 136-51.
10. Selman, M. and A. Pardo, *Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(4): p. 364-72.
11. King, T.E., Jr., A. Pardo, and M. Selman, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Lancet, 2011. **378**(9807): p. 1949-61.
12. Pardo, A. and M. Selman, *Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(12): p. 1534-8.
13. Selman, M. and A. Pardo, *Alveolar epithelial cell disintegrity and subsequent activation: a key process in pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(2): p. 119-21.
14. Hay, E.D., *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. Acta Anat (Basel), 1995. **154**(1): p. 8-20.
15. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
16. Zhang, K., et al., *Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study*. Am J Pathol, 1994. **145**(1): p. 114-25.
17. Tang, L., et al., *Phenotypic change in portal fibroblasts in biliary fibrosis*. Liver, 1994. **14**(2): p. 76-82.

18. Gressner, A.M., *Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis*. *Kidney Int Suppl*, 1996. **54**: p. S39-45.
19. Hogemann, B., et al., *Myofibroblast-like cells produce mRNA for type I and III procollagens in chronic active hepatitis*. *Scand J Gastroenterol*, 1993. **28**(7): p. 591-4.
20. Tang, W.W., G.Y. Van, and M. Qi, *Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis*. *Kidney Int*, 1997. **51**(3): p. 926-31.
21. Antoniadou, H.N., et al., *Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(4): p. 1055-64.
22. Giaid, A., et al., *Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis*. *Lancet*, 1993. **341**(8860): p. 1550-4.
23. Kapanci, Y., et al., *Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. **152**(6 Pt 1): p. 2163-9.
24. Khalil, N., et al., *Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Thorax*, 2001. **56**(12): p. 907-15.
25. Khalil, N., et al., *TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **14**(2): p. 131-8.
26. Khalil, N., et al., *Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1991. **5**(2): p. 155-62.
27. Kasper, M. and G. Haroske, *Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis*. *Histol Histopathol*, 1996. **11**(2): p. 463-83.
28. Katzenstein, A.L., et al., *Usual interstitial pneumonia: histologic study of biopsy and explant specimens*. *Am J Surg Pathol*, 2002. **26**(12): p. 1567-77.
29. Selman, M. and A. Pardo, *The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. **29**(3 Suppl): p. S93-7.
30. Lyonaga, K., et al., *Alterations in cytokeratin expression by the alveolar lining epithelial cells in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. *J Pathol*, 1997. **182**(2): p. 217-24.
31. Barbas-Filho, J.V., et al., *Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual interstitial pneumonia (UIP)*. *J Clin Pathol*, 2001. **54**(2): p. 132-8.
32. Kuwano, K., et al., *P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. **154**(2 Pt 1): p. 477-83.

33. Zeng, P., et al., *TMPRSS4 as an emerging potential poor prognostic factor for solid tumors: A systematic review and meta-analysis*. *Oncotarget*, 2016. **7**(46): p. 76327-76336.
34. Kotani, I., et al., *Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis*. *Thromb Res*, 1995. **77**(6): p. 493-504.
35. Selman, M., et al., *TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment?* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **279**(3): p. L562-74.
36. Zuo, F., et al., *Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(9): p. 6292-7.
37. Lopez-Otin, C. and J.S. Bond, *Proteases: multifunctional enzymes in life and disease*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(45): p. 30433-7.
38. Bertenshaw, G.P., M.T. Norcum, and J.S. Bond, *Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(4): p. 2522-32.
39. Lopez-Otin, C. and L.M. Matrisian, *Emerging roles of proteases in tumour suppression*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(10): p. 800-8.
40. Masson, E., et al., *Trypsinogen copy number mutations in patients with idiopathic chronic pancreatitis*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008. **6**(1): p. 82-8.
41. Red Eagle, A.R., et al., *Meprin beta metalloprotease gene polymorphisms associated with diabetic nephropathy in the Pima Indians*. *Hum Genet*, 2005. **118**(1): p. 12-22.
42. Qiu, D., et al., *Roles and regulation of membrane-associated serine proteases*. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 3): p. 583-7.
43. Werb, Z., *ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology*. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 439-42.
44. Murphy, G. and J. Gavrilovic, *Proteolysis and cell migration: creating a path?* *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**(5): p. 614-21.
45. Ellis, V. and G. Murphy, *Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion*. *FEBS Lett*, 2001. **506**(1): p. 1-5.
46. Netzel-Arnett, S., et al., *Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2003. **22**(2-3): p. 237-58.
47. Hooper, J.D., et al., *Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(2): p. 857-60.
48. Bugge, T.H., T.M. Antalis, and Q. Wu, *Type II transmembrane serine proteases*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(35): p. 23177-81.
49. Szabo, R., et al., *Type II transmembrane serine proteases*. *Thromb Haemost*, 2003. **90**(2): p. 185-93.
50. Choi, S.Y., et al., *Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections*. *Trends Mol Med*, 2009. **15**(7): p. 303-12.

51. Louvard, D., et al., *On the distribution of enterokinase in porcine intestine and on its subcellular localization*. *Biochim Biophys Acta*, 1973. **309**(1): p. 127-37.
52. Fonseca, P. and A. Light, *The purification and characterization of bovine enterokinase from membrane fragments in the duodenal mucosal fluid*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(23): p. 14516-20.
53. Yasuoka, S., et al., *Purification, characterization, and localization of a novel trypsin-like protease found in the human airway*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. **16**(3): p. 300-8.
54. Lin, C.Y., et al., *Purification and characterization of a complex containing matriptase and a Kunitz-type serine protease inhibitor from human milk*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(26): p. 18237-42.
55. Bertram, S., et al., *TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells*. *J Virol*, 2010. **84**(19): p. 10016-25.
56. Wallrapp, C., et al., *A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(10): p. 2602-6.
57. Jung, H., et al., *TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition*. *Oncogene*, 2008. **27**(18): p. 2635-47.
58. Park, Y., *TMPRSS4 (transmembrane protease, serine 4)*. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2010. **14**(8): p. 785-787.
59. Nguyen, T.H., et al., *Expression of TMPRSS4 in non-small cell lung cancer and its modulation by hypoxia*. *Int J Oncol*, 2012. **41**(3): p. 829-38.
60. Butterworth, M.B., et al., *Regulation of the epithelial sodium channel by membrane trafficking*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **296**(1): p. F10-24.
61. Bhalla, V. and K.R. Hallows, *Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications*. *J Am Soc Nephrol*, 2008. **19**(10): p. 1845-54.
62. Vuagniaux, G., et al., *Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in Xenopus Oocytes*. *J Gen Physiol*, 2002. **120**(2): p. 191-201.
63. Passero, C.J., et al., *TMPRSS4-dependent activation of the epithelial sodium channel requires cleavage of the gamma-subunit distal to the furin cleavage site*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. **302**(1): p. F1-8.
64. Wodopia, R., et al., *Hypoxia decreases proteins involved in epithelial electrolyte transport in A549 cells and rat lung*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **279**(6): p. L1110-9.
65. Ohler, A. and C. Becker-Pauly, *Morpholino knockdown of the ubiquitously expressed transmembrane serine protease TMPRSS4a in zebrafish embryos exhibits severe defects in organogenesis and cell adhesion*. *Biol Chem*, 2011. **392**(7): p. 653-64.
66. Grutzmann, R., et al., *Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays*. *Neoplasia*, 2004. **6**(5): p. 611-22.

67. Iacobuzio-Donahue, C.A., et al., *Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies*. *Cancer Res*, 2003. **63**(24): p. 8614-22.
68. Kebebew, E., et al., *ECM1 and TMPRSS4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy*. *Ann Surg*, 2005. **242**(3): p. 353-61; discussion 361-3.
69. Ma, X.J., et al., *Molecular classification of human cancers using a 92-gene real-time quantitative polymerase chain reaction assay*. *Arch Pathol Lab Med*, 2006. **130**(4): p. 465-73.
70. Riker, A.I., et al., *The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis*. *BMC Med Genomics*, 2008. **1**: p. 13.
71. Pardo, A., et al., *Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis*. *PLoS Med*, 2005. **2**(9): p. e251.
72. Kim, S., et al., *TMPRSS4 induces invasion and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of integrin alpha5 and its signaling pathways*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(4): p. 597-606.
73. Larzabal, L., et al., *TMPRSS4 regulates levels of integrin alpha5 in NSCLC through miR-205 activity to promote metastasis*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(3): p. 764-74.
74. Gregory, P.A., et al., *The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(5): p. 593-601.
75. Wu, H. and Y.Y. Mo, *Targeting miR-205 in breast cancer*. *Expert Opin Ther Targets*, 2009. **13**(12): p. 1439-48.
76. Gandellini, P., et al., *miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon*. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2287-95.
77. Min, H.J., et al., *TMPRSS4 upregulates uPA gene expression through JNK signaling activation to induce cancer cell invasion*. *Cell Signal*, 2014. **26**(2): p. 398-408.
78. Min, H.J., et al., *TMPRSS4 induces cancer cell invasion through pro-uPA processing*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **446**(1): p. 1-7.
79. Varjosalo, M. and J. Taipale, *Hedgehog signaling*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 1): p. 3-6.
80. Pardo, A., et al., *Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **167**(6): p. 925-32.
81. Woessner, J.F., Jr., *The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid*. *Arch Biochem Biophys*, 1961. **93**: p. 440-7.
82. Herrera, I., et al., *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): p. 25964-75.

83. Pardo, A., et al., *Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. *Respir Res*, 2016. **17**: p. 23.
84. Afratis, N.A., et al., *Emerging insights into the role of matrix metalloproteases as therapeutic targets in fibrosis*. *Matrix Biol*, 2018.
85. Tanabe, L.M. and K. List, *The role of type II transmembrane serine protease-mediated signaling in cancer*. *FEBS J*, 2017. **284**(10): p. 1421-1436.
86. Bardou, O., et al., *Membrane-anchored Serine Protease Matriptase Is a Trigger of Pulmonary Fibrogenesis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016. **193**(8): p. 847-60.
87. Szabo, R. and T.H. Bugge, *Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 213-35.
88. Kim, S. and J.W. Lee, *Membrane Proteins Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Invasion: Studies on TMPRSS4 and TM4SF5*. *Genomics Inform*, 2014. **12**(1): p. 12-20.
89. Kim, K.K., et al., *Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(35): p. 13180-5.
90. Yamaguchi, M., et al., *Fibroblastic foci, covered with alveolar epithelia exhibiting epithelial-mesenchymal transition, destroy alveolar septa by disrupting blood flow in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Lab Invest*, 2017. **97**(3): p. 232-242.
91. Lahiry, P., et al., *A mutation in the serine protease TMPRSS4 in a novel pediatric neurodegenerative disorder*. *Orphanet J Rare Dis*, 2013. **8**: p. 126.
92. Wu, X., et al., *Clinical importance and therapeutic implication of E-cadherin gene methylation in human ovarian cancer*. *Med Oncol*, 2014. **31**(8): p. 100.
93. Okada, H., et al., *Possible mechanisms of renal fibrosis*. *Contrib Nephrol*, 1996. **118**: p. 147-54.
94. Nieto, M.A., et al., *Emt: 2016*. *Cell*, 2016. **166**(1): p. 21-45.
95. Medici, D., E.D. Hay, and B.R. Olsen, *Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(11): p. 4875-87.
96. Short, S.P., et al., *p120-Catenin is an obligate haploinsufficient tumor suppressor in intestinal neoplasia*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(12): p. 4462-4476.
97. Afshari, P., W.D. Yao, and F.A. Middleton, *Reduced Slc1a1 expression is associated with neuroinflammation and impaired sensorimotor gating and cognitive performance in mice: Implications for schizophrenia*. *PLoS One*, 2017. **12**(9): p. e0183854.
98. Echtenacher, B., D.N. Mannel, and L. Hultner, *Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis*. *Nature*, 1996. **381**(6577): p. 75-7.

99. Heissig, B., et al., *Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 739-50.
100. Iba, Y., et al., *Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(14): p. 1873-80.
101. Weller, K., et al., *Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice*. FASEB J, 2006. **20**(13): p. 2366-8.
102. Cruse, G. and P. Bradding, *Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease*. Eur J Pharmacol, 2016. **778**: p. 125-38.
103. Wygrecka, M., et al., *Mast cells and fibroblasts work in concert to aggravate pulmonary fibrosis: role of transmembrane SCF and the PAR-2/PKC-alpha/Raf-1/p44/42 signaling pathway*. Am J Pathol, 2013. **182**(6): p. 2094-108.
104. Hunt, L.W., et al., *Immunofluorescent staining for mast cells in idiopathic pulmonary fibrosis: quantification and evidence for extracellular release of mast cell tryptase*. Mayo Clin Proc, 1992. **67**(10): p. 941-8.
105. Andersson, C.K., et al., *Activated MCTC mast cells infiltrate diseased lung areas in cystic fibrosis and idiopathic pulmonary fibrosis*. Respir Res, 2011. **12**: p. 139.
106. Strutz, F., et al., *Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation*. Kidney Int, 2002. **61**(5): p. 1714-28.
107. Yang, J., et al., *Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1525-38.
108. Schuliga, M., et al., *The fibrogenic actions of the coagulant and plasminogen activation systems in pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2018. **97**: p. 108-117.
109. Santibanez, J.F., et al., *Transforming growth factor-beta, matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition*. Dev Dyn, 2018. **247**(3): p. 382-395.
110. Mali, A.V., et al., *Enterolactone Suppresses Proliferation, Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Through Inhibition of uPA Induced Plasmin Activation and MMPs-Mediated ECM Remodeling*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. **18**(4): p. 905-915.

# APÉNDICE

## **Artículo de Requisito**

RESEARCH ARTICLE

# Transmembrane protease, serine 4 (TMPRSS4) is upregulated in IPF lungs and increases the fibrotic response in bleomycin-induced lung injury

Ana Valero-Jiménez<sup>1</sup>, Joaquín Zúñiga<sup>1\*</sup>, José Cisneros<sup>1</sup>, Carina Becerri<sup>1</sup>, Alfonso Salgado<sup>1</sup>, Marco Checa<sup>1</sup>, Ivette Buendía-Roldán<sup>1</sup>, Criselda Mendoza-Milla<sup>1</sup>, Miguel Gaxiola<sup>1</sup>, Annie Pardo<sup>2</sup>, Moisés Selman<sup>1,2</sup>

**1** Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, México, **2** Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

\* These authors contributed equally to this work.

\* [mosen@ yahoo.com.mx](mailto:mosen@ yahoo.com.mx)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Valero-Jiménez A, Zúñiga J, Cisneros J, Becerri C, Salgado A, Checa M, et al. (2018) Transmembrane protease, serine 4 (TMPRSS4) is upregulated in IPF lungs and increases the fibrotic response in bleomycin-induced lung injury. *PLoS ONE* 13(3): e0192963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192963>

**Editor:** Tim D. Oury, University of Pittsburgh, UNITED STATES

**Received:** September 8, 2017

**Accepted:** February 1, 2018

**Published:** March 12, 2018

**Copyright:** © 2018 Valero-Jiménez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (numbers 234088 and 251636) and Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and progressive lung disease characterized by epithelial cell activation, expansion of the fibroblast population and excessive extracellular matrix accumulation. The mechanisms are incompletely understood but evidence indicates that the deregulation of several proteases contributes to its pathogenesis. Transmembrane protease serine 4 (TMPRSS4) is a novel type II transmembrane serine protease that may promote migration and facilitate epithelial to mesenchymal transition (EMT), two critical processes in the pathogenesis of IPF. Thus, we hypothesized that over-expression of TMPRSS4 in the lung could promote the initiation and/or progression of IPF. In this study we first evaluated the expression and localization of TMPRSS4 in IPF lungs by real time PCR, western blot and immunohistochemistry. Then we examined the lung fibrotic response in wild-type and TMPRSS4 deficient mice using the bleomycin-induced lung injury model. We found that this protease is upregulated in IPF lungs, where was primarily expressed by epithelial and mast cells. Paralleling the findings in vivo, TMPRSS4 was expressed by alveolar and bronchial epithelial cells in vitro and unexpectedly, provoked an increase of E-cadherin. No expression was observed in normal human or IPF lung fibroblasts. The lung fibrotic response evaluated at 28 days after bleomycin injury was markedly attenuated in the haploinsufficient and deficient TMPRSS4 mice. By morphology, a significant reduction of the fibrotic index was observed in KO and heterozygous mice which was confirmed by measurement of collagen content (hydroxyproline: WT: 164±21.1 µg/lung versus TMPRSS4 haploinsufficient: 110.2±14.3 µg/lung and TMPRSS4 deficient mice: 114.1±24.2 µg/lung (p<0.01)). As in IPF, TMPRSS4 was also expressed in epithelial and mast cells. These findings indicate that TMPRSS4 is upregulated in IPF lungs and that may have a profibrotic role.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most aggressive of the interstitial lung diseases (ILD), leading to respiratory failure and premature death with a median life expectancy of about three years from diagnosis [1, 2]. IPF is characterized by the abnormal activation of alveolar epithelial cells, which produce a variety of mediators causing migration, proliferation and differentiation of fibroblasts into myofibroblasts which in turn secrete large amounts of extracellular matrix resulting in abnormal remodeling of the lung architecture [1, 3, 4].

A number of mediators including cytokines, growth factors and proteolytic enzymes have been implicated in the development of the disease. However, the biopathological processes leading to IPF and the mechanisms responsible for the abnormal activation of epithelial cells and fibroblasts have not been elucidated.

Proteases play crucial roles in a large variety of physiologic and pathological processes including the degradation of basement membrane and extracellular matrix (ECM) and tissue remodeling [5, 6], and particularly, several matrix metalloproteases have been found deregulated in IPF [7]. In humans, more than 2% of the genes code for a complex system of more than 700 proteases and inhibitors of proteases [8].

Recently, much attention has been focused on the role of type II transmembrane serine proteases (TTSPs) in physiological and pathological processes. These proteases are cell surface-associated enzymes that have in common an extracellular domain, a single-pass transmembrane domain, a short intracellular domain, and a variable-length stem region containing modular structural domains [9–11]. Although a few of the TTSPs are expressed across several tissues and cell types, in general these enzymes demonstrate relatively restricted expression patterns, indicating that they may have tissue-specific functions [9].

To date, 20 TTSPs have been identified in mouse and humans and most of them are over-expressed in a variety of tumor or other pathologic conditions compared to normal tissues. In addition to cancer, altered expression and activity of these enzymes has been found in some chronic non-neoplastic disorders such as atherosclerosis, arthritis and neurodegenerative processes, where they may contribute to the initiation or progression of these diseases [7].

TMPRSS4 is a novel TTSP that is highly expressed in a variety of cancers where it has been implicated in their pathogenesis and invasion [12–15]. Moreover, a recent meta-analysis study indicates that high TMPRSS4 expression in solid tumor tissues is associated with poor overall survival and short time to tumor progression [16].

To date this protease has not been studied in fibrotic lung diseases. Since TMPRSS4 is involved in some processes that may contribute to the pathogenesis of IPF such as migration and epithelial to mesenchymal transition (EMT) we hypothesized that it may be involved in the initiation and/or progression of this disease. Our results demonstrated that TMPRSS4 is upregulated in epithelial and mast cells in IPF lungs and that the fibrotic response to bleomycin is attenuated in TMPRSS4-deficient mice suggesting a profibrotic role for this protease.

## Material and methods

### Quantitative PCR

TMPRSS4 gene expression was quantified in lung homogenates from patients with IPF and hypersensitivity pneumonitis (HP) while normal control RNA samples were obtained from commercial sources (Ambion AM7968, Agilent 540019). For some experiments we used RNA from different cell cultures. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Scientific, K1632) according to the manufacturer's

instructions. TaqMan probes were designed at Applied Biosystems (4331182) and TaqMan PCR Master Mix (4304437) and qPCR was performed in a Rotor-Gene Q Instrument (QIAGEN, Hilden, Germany). Samples were run in triplicates using 18S rRNAs reference gene.

### Cell culture

Human alveolar (A549) (CCL-185) and bronchial (HBE4-E6/E7) (CRL-2078) epithelial cell lines, lung epithelial cells from rat (RLE-6TN; CRL-2300) and human lung fibroblasts CCD-25Lu (CCL-215) and CCD-8Lu (CCL-201) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown at 37°C in a gas mixture of 5% CO<sub>2</sub> / 95% air in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks (T-25; Corning, Costar) containing culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY), 100 U/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, and 2.5 mg/ml of amphotericin B until were plated for experiments.

A549 cells and fibroblasts were grown in F12 medium (GIBCO, 21700-075) and bronchial cells in Defined Keratinocyte-SFM (GIBCO, 10744) supplemented with bovine pituitary extract (0.05 mg/mL), epidermal growth factor (5 ng/mL) and cholera toxin (10 ng/mL). RLE-6TN cells were grown in Ham's F12 medium supplemented with bovine pituitary extract (0.01 mg/mL), insulin (5 ng/mL), insulin-like growth factor (2.5 ng/mL), transferrin (1.25 µg/mL), EGF (2.5 ng/mL), and 10% FBS.

### Growth rate assay

Epithelial cells were seeded in 96-well culture plates at a cell density of 2800 per well and incubated in F12 supplemented with 10% FBS at standard conditions. After 24 h, the medium was replaced by serum-free medium alone or with human recombinant TMPRSS4 [Origene, TP303972 (0.1, 1, 10 and 100 ng/mL)], and the cells were maintained in culture for 48 or 96 h. Cell growth was determined using the cell proliferation reagent WST-1 (Boehringer, Mannheim, Germany) as described [17]. All assays were performed in triplicate.

### Immunohistochemistry (IHC)

We examined the localization of TMPRSS4 in five IPF and three normal lungs. Immunohistochemical analysis was performed as described [17]. Briefly, formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues were obtained from biopsy or autopsy specimens of individuals with IPF and controls in compliance with institutional review board-approved protocols. Lung tissue blocks were cut in 3 µm sections. After antigen unmasking using citrate buffer at 90°C for 30 min, and blocking with 2% of normal pig serum in PBS, intervening sections were incubated for 18 h at 4°C with anti-TMPRSS4 monoclonal antibody [Santa Cruz Biotechnology/ sc-376415 (1:100)] diluted in PBS with 2% of serum. Sections were then incubated with a secondary biotinylated anti-immunoglobulin antibody followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA). 3-Amino-9-ethylcarbazol in acetate buffer containing 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as substrate. The primary antibody was replaced by nonimmune serum for negative control slides [17]. The same protocol was used for mouse lung sections from the bleomycin-induced lung fibrosis model but using anti-TMPRSS4 polyclonal antibody [Cusabio/CSB-PA023926GA01Hu (1:50)].

### Immunofluorescence staining and confocal microscopy

For immunofluorescence, 3 µm thick tissue sections adhered to silanized slides (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) were used. After heat-induced antigen retrieval in citrate buffer, samples were permeabilized and blocked in a single step incubating them for 30 minutes in

PBS with 2% normal goat/porcine serum and 0.5% Triton X-100 (Research Organic, Cleveland, OH, USA) at room temperature (RT). Afterwards samples were washed and incubated at 4°C overnight with primary antibodies: anti-TMPRSS4 [Santa Cruz Biotechnology/ sc-376415 (1:100)], anti-Trypsin [Abcam/ ab-151757 (1:250)] and anti-Chymase [Abcam/ ab-111239 (1:300)]. The next day samples were washed and incubated for 1 hour at RT with fluorescent secondary antibodies (Alexa Fluor [AF]-488 conjugated donkey anti-Rabbit IgG, Dylight-549 conjugated donkey anti-mouse IgG and AF-647 conjugated donkey anti-goat IgG; (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Nuclei were stained with NucBlue (Life Technologies, Carlsbad, CA). Samples were mounted with ProLong Gold mounting media (Life Technologies). All experiments included controls with/without primary antibody or with/without secondary antibody. Imaging was performed with an FV-1000 confocal laser scanning microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) in sequential scanning mode to image each fluorochrome separately.

### Western blot

Cellular lysates from alveolar (A549) and bronchial (HBE4-E6/E7) (CRL-2078) human epithelial cells, and from human normal and IPF fibroblasts were prepared using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml aprotinin). Protein concentration was quantified using Bradford assay (Bio-Rad, Hercules CA). Proteins were mixed with Laemmli sample buffer and 40 μg were loaded on denaturing 10% SDS-polyacrylamide gels, electro-transferred to nitrocellulose membranes and subsequently blocked with 5% skim milk for 1 h. Membranes were incubated overnight at 4°C or 1 h at room temperature with the primary antibodies: TMPRSS4 [Santa Cruz Biotechnology/ sc-376415 (1:500)], E-cadherin [BioGenex/ MU390-UC (1:150); Santa Cruz Biotechnology/ sc-7870 (1:200)] and alpha-SMA [SIGMA/ A2547 (1:100)]. In some experiments, immunoblotting was performed in A549 cells stimulated with 100 ng/ml TMPRSS4 recombinant protein (Origene/ TP303972) and 5 ng/ml TGF-β1 (R&D Systems/ 240-B/CF). After primary antibodies incubation, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG antibodies (Invitrogen Life Technologies) for 1 h at room temperature. Signal was detected by chemiluminescence (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific/ 34080) and densitometry was performed using the Image Lab software (Bio-Rad Laboratories, Inc.). All samples were normalized against beta-tubulin [Santa Cruz Biotechnology/ sc-5274HRP (1:200)] or beta-actin [Santa Cruz Biotechnology/ sc-47778 (1:200)].

### Bleomycin-induced lung fibrosis

**Ethics approval and consent to participate.** The study protocol for tissue donation from patients and all experiments, including those on mice, were conducted according to the institutional guidelines. Informed consent was obtained for each individual patient. Animal use had complied with the Animal Care guidelines. This protocol was approved by the Bioethics Committee of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) (B30-12) in Mexico City.

**Animals.** TMPRSS4 deficient mice with C57BL/6 background were obtained from the MMRRRC at University of California, Davis. Wild-type littermates were used as controls. Mice were housed in specific pathogen-free facilities and used for experiments at 8–12 weeks of age. Animals received sterile food and water *ad libitum* and were handled aseptically. Genotyping of the mice was performed by direct polymerase chain reaction of lysed murine tissue

(PRIMERS: for: AACTTCACAGAAGCCTGGCC, rev: TGGGATTCAAACGTGGTTCCTT and for: GCAGCGCATCGCCTTCTATTC, rev: TGGGATTCAAACGTGGTTCCTG).

**Anesthesia.** Mice were anesthetized with AVERTIN, a mixture of 222-tribromoethanol (SIGMA Aldrich, T4840-2) and t-amyl alcohol (SIGMA Aldrich, A1685) for the instillation of BLM and also to euthanize them at the end of experiments which was done by Exsanguination/Cardiac Perfusion. We made all the efforts to alleviate suffering.

**Bleomycin-induced pulmonary fibrosis.** We first made a dose-response analysis (1, 3, 5 and 7 U/Kg), and found that the best model was obtained with 7U/Kg (0.07 U/10g) with a similar 15–20% mortality between WT, HT and KO mice. Wild type (WT), heterozygous (HT) and deficient (KO) mice were randomly divided into two groups and instilled with PBS (control group) or bleomycin (experimental group). BLM sulfate (BLEOLEM) was dissolved in PBS and instilled intratracheally at a dose of 7 U/Kg (final volume: 50  $\mu$ l/mouse) using a single application. On day 28, mice were sacrificed and lungs were removed. Left lungs were used to measure hydroxyproline content and right lungs were fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned. Tissue sections of 3  $\mu$ m thickness were stained with hematoxylin-eosin (HE) and Masson's Trichrome. The severity of lung fibrosis was determined using a semiquantitative histopathological scoring method. First, it was determined the extent of lesions ranging from 0–100% of the slide and then the percent of fibrosis by trichromic staining. A fibrotic index was calculated multiplying the extent of the lesions X the percent of fibrosis [18].

**Hydroxyproline assay.** Collagen quantification was performed by hydroxyproline assay as previously described [19]. Left lungs were consistently used to allow comparisons. Data were expressed as micrograms of hydroxyproline per lung.

### Statistical analysis

Differences were evaluated by unpaired T-test (parametric data) with Welch's correction for real-time PCR in tissues. For the other experiments P values were calculated by using one-way ANOVA test. All data were expressed as mean  $\pm$  SD of 3 or 4 determinations. P values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

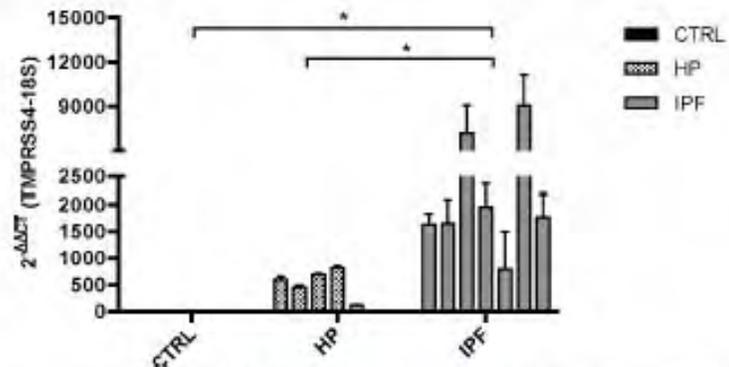
### TMPRSS4 is overexpressed in IPF lungs

We first evaluated by real-time qPCR the expression of TMPRSS4 in lung samples from IPF patients (n = 7) compared with normal tissues (n = 4) and hypersensitivity pneumonitis (HP, n = 6). Demographic and functional data of the patients are included in [S1 Table](#). HP samples were used because it represents an inflammatory-driven ILD that often evolve to fibrosis. As shown in [Fig 1](#) TMPRSS4 was virtually not expressed in control lungs while it was modestly expressed in HP and strongly upregulated in IPF tissues ( $p < 0.05$ , IPF versus controls and HP).

### TMPRSS4 is expressed by epithelial and mast cells

TMPRSS4 cell localization was examined by immunohistochemistry. Paralleling the gene expression results, no immunoreactive protein was observed in the control lungs. In IPF lungs, strong positive labeling was noticed in interstitial cells while a positive but weaker staining was observed in alveolar epithelial cells ([Fig 2](#)). The expression of TMPRSS4 was observed primarily in the fibrotic areas. No staining was detected in fibroblasts.

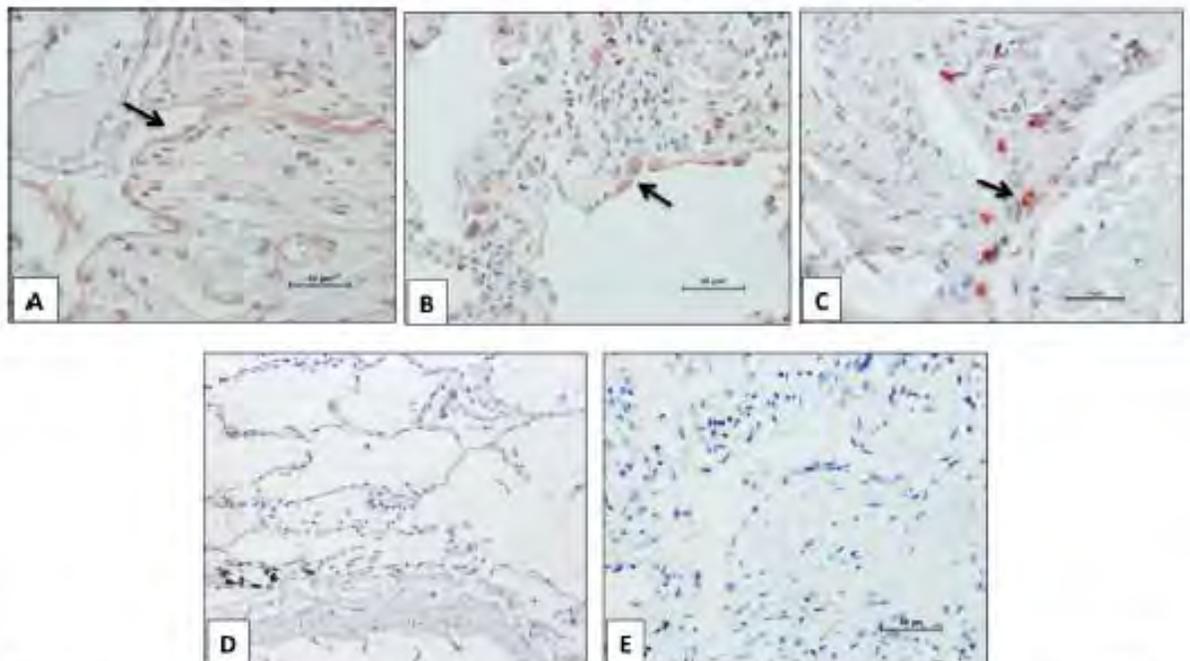
Sequential slides of a single IPF biopsy stained with TMPRSS4 specific antibody and toluidine blue suggested that the TMPRSS4-expressing interstitial cells could be mast cells and to



**Fig 1. TMPRSS4 is upregulated in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) lungs.** Gene expression of TMPRSS4 was quantified by real-time PCR in total RNA obtained from IPF (n = 7), hypersensitivity pneumonitis (HP) (n = 6) and normal lungs (n = 4). Strong upregulation was observed in IPF tissues compared with HP and control lungs. Data are expressed as means ± SD of copy number normalized to 18S rRNA. \* p<0.05, IPF versus control and HP.

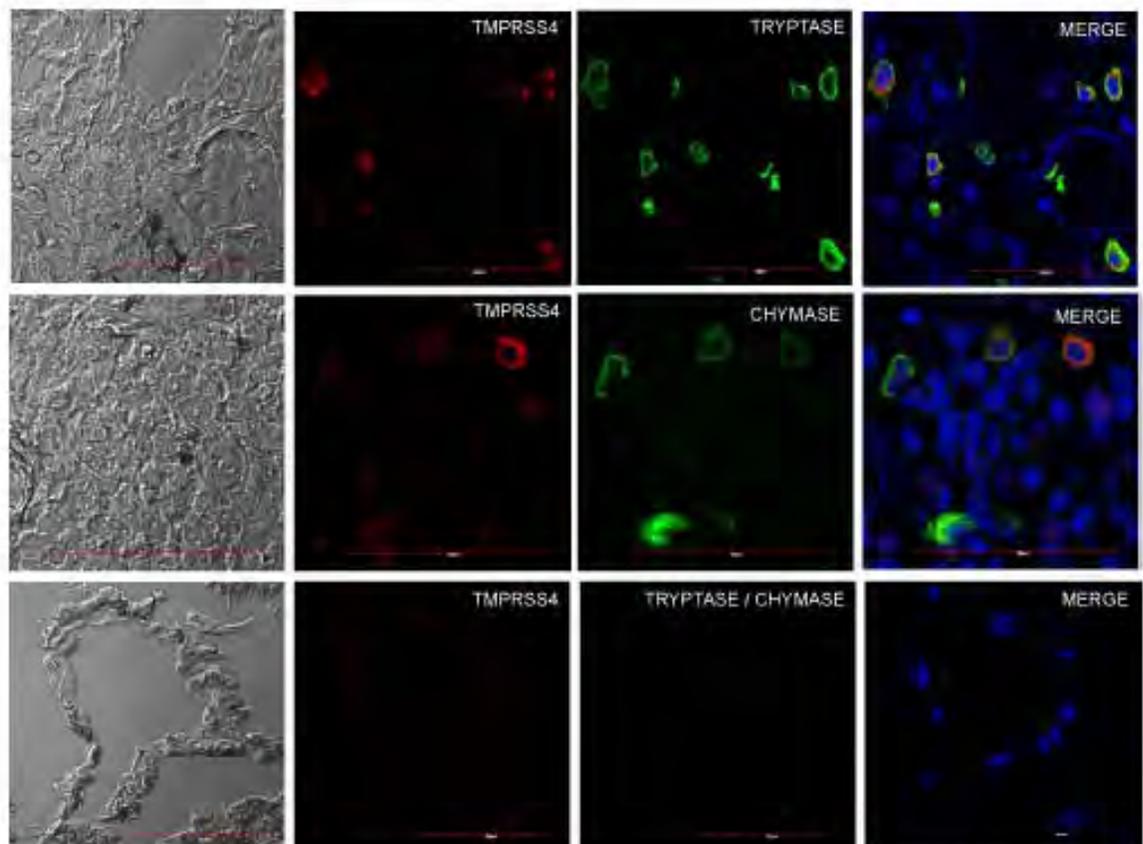
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192983.g001>

confirm this finding, we co-localized TMPRSS4 with tryptase and chymase, two proteases present in the granular content of mast cells that are commonly used as markers of these cells.



**Fig 2. Immunolocalization of TMPRSS4 in IPF and control lungs.** Representative photomicrographs of immunohistochemical staining performed with antibody against TMPRSS4 in lung tissue sections. Strong staining was observed in epithelial (panels A and B) and interstitial cells (panel C) in IPF lungs (n = 5), whereas no positive labeling was detected in normal lungs (n = 3) (panel D). Panel E shows the negative control where the specific antibody was omitted. All sections were counterstained with hematoxylin. Arrows indicate positive cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192983.g002>



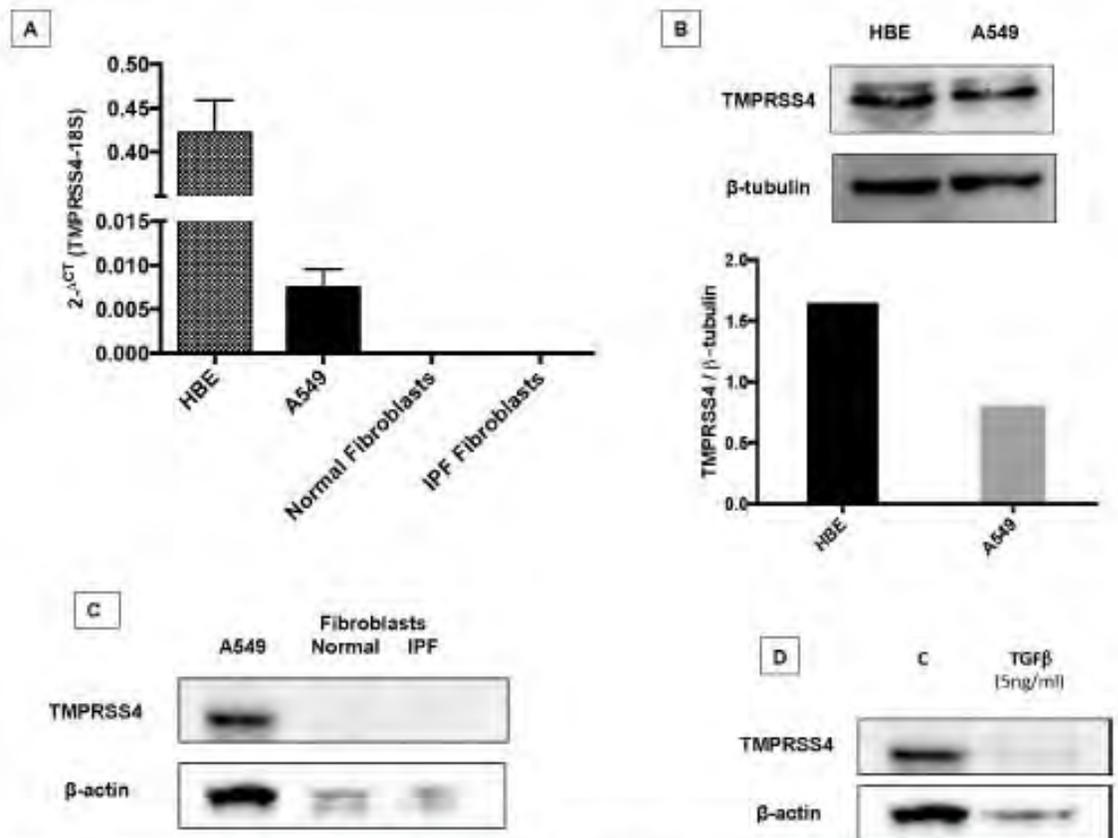
**Fig 3. Co-localization of TMPRSS4, tryptase and chymase in IPF and control lungs.** Representative images of immunofluorescence staining performed with specific antibodies against each molecule in lung tissue sections from IPF patients. Top and central row: IPF tissues coexpressing TMPRSS4 and tryptase or chymase; bottom row: normal lung showing no expression. Tissues were stained for TMPRSS4 (Dylight-549, red), tryptase (AF 488, green upper panel) and chymase (AF-647, green middle panel). The colocalization of TMPRSS4 and tryptase or chymase was determined by fluorescence microscopy and images were merged to resolve the co-localization of these proteins. Co-localization of TMPRSS4 was observed with both tryptase and chymase. Data are representative of three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192963.g003>

As illustrated in [Fig 3](#), confocal microscopy analysis revealed the co-localization of TMPRSS4 with both enzymes in IPF samples.

### TMPRSS4 is expressed by epithelial and bronchial cells in vitro but not by fibroblasts

To corroborate the IHC results, we measured the gene and protein expression of TMPRSS4 in normal human and IPF lung fibroblasts and in two epithelial cell lines, one from alveolar origin (A549) and another of bronchial origin (HBE). As shown in [Fig 4A–4C](#), neither normal nor IPF derived fibroblasts expressed TMPRSS4 while both epithelial cell lines did it at mRNA and protein level. We also explored the effect of TGF- $\beta$ 1 on the expression of TMPRSS4 in A549 epithelial cells, and a decrease of TMPRSS4 was observed at 96 hours ([Fig 4D](#)).



**Fig 4. TMPRSS4 is expressed by alveolar and bronchial epithelial cells.** Panel A: Gene levels of TMPRSS4 were quantified by real-time RT-PCR in A549 and HBE4 E6/E7 epithelial cells and in normal (n = 3) and IPF lung fibroblasts (n = 3). Expression was observed in both epithelial cell lines while no expression was found in fibroblasts. Panel B: Protein expression of TMPRSS4 (48 KDa) was confirmed by western blot in both epithelial cell lines. Panel C: Representative Western blot of TMPRSS4 in normal and IPF lung fibroblasts. A549 epithelial cells were used as positive control. Panel D: Western blot of A549 epithelial cells stimulated with TGFβ1 for 96 hours.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192953.g004>

### TMPRSS4 increases the expression of E-cadherin

Prior evidence suggested that TMPRSS4 promotes EMT [20]. Since this process has been implicated in the pathogenesis of IPF [21, 22], we examined whether TMPRSS4 may induce EMT on alveolar epithelial cells. For this purpose the levels of E-cadherin and α-SMA were analyzed in TMPRSS4-treated and untreated epithelial cells. Unexpectedly, TMPRSS4 increased the expression of E-cadherin at the gene and protein levels (Fig 5A and 5B). Likewise TMPRSS4 reduced the expression of α-SMA gene by RT-PCR (Fig 5C), but gave variable results at the protein level where we observed either a decrease (Fig 5D) or no changes. The increase of E-cadherin induced by TMPRSS4 was confirmed in rat (RLE-6TN) alveolar epithelial cells (Fig 5E). Since the activation of TGF-β signaling causes epithelial to mesenchymal transition (EMT), a process that include the downregulation of the expression of E-cadherin, we thought to evaluate the impact of TMPRSS4 on this process. A549 epithelial cells were treated with TGF-β alone, TGF-β1 plus TMPRSS4, or TMPRSS4 alone, and the expression of

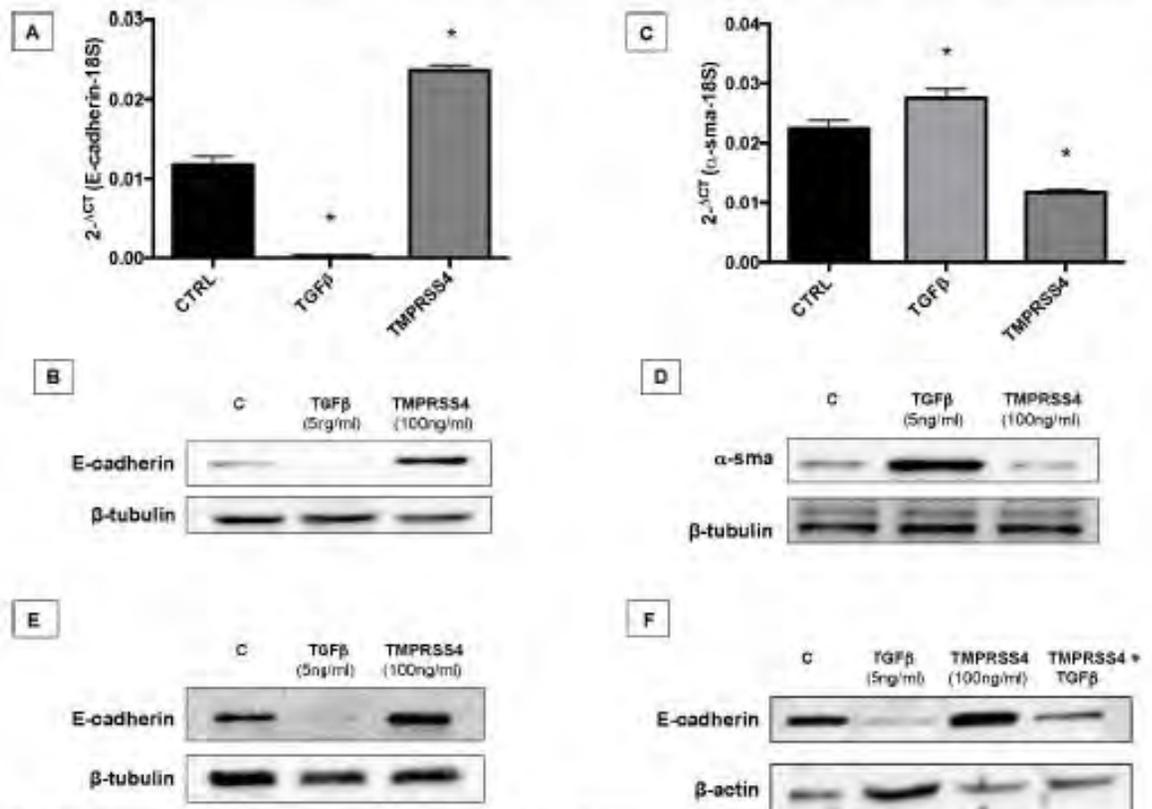
the protein was examined at 4 days by Western blot. As shown in Fig 5E, TMPRSS4 partially inhibited the strong decrease of E-cadherin induced by TGF- $\beta$ 1, further supporting the effect of this type II transmembrane serine protease on the cell adhesion protein.

### TMPRSS4 reduces the growth rate of alveolar epithelial cells

Stimulation of A549 epithelial cell line with TMPRSS4 recombinant protein induced a decrease in the growth rate measured by cell viability WST-1 assay. The analysis of the time and dose-response curve showed that the inhibitory effect of TMPRSS4 depends on the concentration achieving a significant effect at a protein concentration of 100 ng/mL at 4 days after stimulation (Fig 6A and 6B).

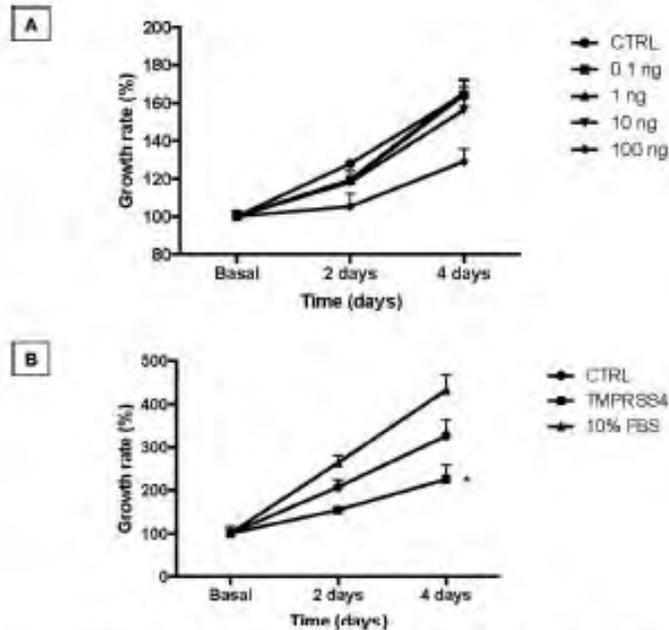
### TMPRSS4 deficiency attenuates bleomycin-induced lung fibrosis in mice

To define the effect of TMPRSS4 on the development of lung fibrosis, wild-type and TMPRSS4 heterozygous (+/-) and deficient (-/-) mice were treated with a single instillation of bleomycin.



**Fig 5. TMPRSS4 increases E-cadherin expression.** Human alveolar epithelial cells (A549) were stimulated with TMPRSS4 (100 ng/ml) or TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml), and the expression of E-cadherin and  $\alpha$ -SMA was determined by quantitative RT-PCR and Western blot. Panel A and C: At 4 days, TMPRSS4 significantly increased the level of E-cadherin mRNA and reduced  $\alpha$ -SMA mRNA compared with control sample (\* $p$  < 0.01). Data were normalized to the level of 18S rRNA. Panel B and D: Total protein from stimulated cells was extracted and western blot analysis performed with specific antibodies for E-cadherin and  $\alpha$ -SMA. TGF- $\beta$ 1 was used as a positive control for EMT. Panel E: Rat (RLE-6TN) alveolar epithelial cells were stimulated with TMPRSS4 (100 ng/ml) or TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) for 4 days. Westerns are representative of three independent experiments. Panel F: Western blot analysis of control A549 epithelial cells and A549 stimulated with TGF- $\beta$ 1, TMPRSS4 or TGF- $\beta$ 1 plus TMPRSS4.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192963.g005>



**Fig 6. TMPRSS4 reduces alveolar epithelial growth rate.** Panel A: Human alveolar epithelial cells (A549) were cultured in 48-well culture plates in medium without FBS and stimulated with TMPRSS4 (0.1, 1, 10 and 100 ng/ml). Panel B: The analysis was repeated with 100 ng/ml in two independent experiments. Cell numbers were estimated by WST-1 assay at 4 days of culture. Each point represents means  $\pm$  SD of one representative experiment performed in triplicate. \* $P < 0.05$ .

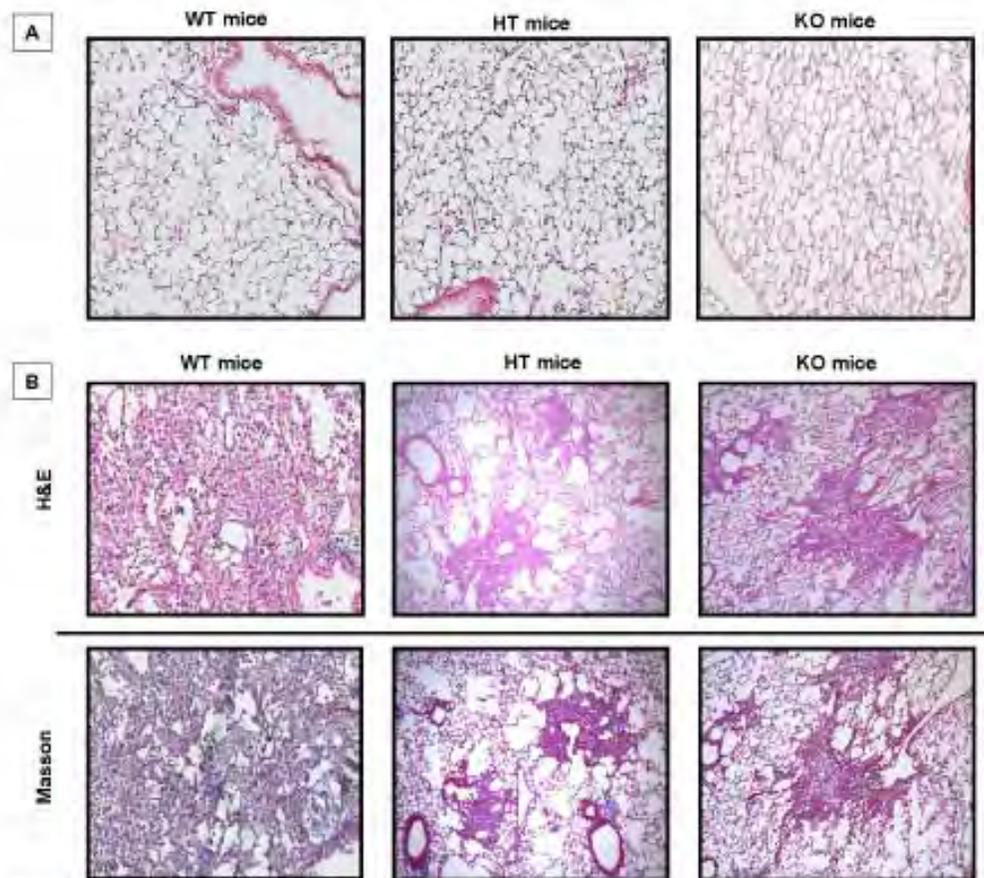
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192963.g006>

(7U/Kg) or saline solution and sacrificed at 28 days. The fibrotic response was examined by lung morphology and hydroxyproline content. Histopathologic assessment showed severe scarring in the wild type bleomycin-injured animals that was markedly reduced in TMPRSS4 knockout and haploinsufficient mice (Fig 7). The morphologic fibrotic index was significantly reduced in KO ( $560.7 \pm 338.4$ ) and HT ( $446.5 \pm 259.7$ ) mice versus WT animals ( $1100.0 \pm 514.24$ ) ( $p < 0.01$ ). We then determined collagen content by using the hydroxyproline assay on the whole left lung. On basal conditions, no differences in hydroxyproline content were found. At 28 days post-bleomycin instillation we observed a substantial increase of collagen concentration in the WT mice, which was significantly reduced in TMPRSS4 (+/-) and (-/-) deficient mice ( $164 \pm 21.1$   $\mu$ g OH-Pro/lung versus  $110.2 \pm 14.3$   $\mu$ g OH-Pro/lung and  $114.1 \pm 24.2$   $\mu$ g OH-Pro/lung respectively;  $p < 0.01$ ) (Fig 8). No differences were observed between TMPRSS4 haploinsufficient and deficient mice.

As detected in IPF, in WT mice TMPRSS4 was expressed by epithelial cells and more intensely by interstitial cells (Fig 9A–9E). Immunocolocalization with tryptase demonstrated that the interstitial cells were mast cells (Fig 8E–8I).

## Discussion

IPF is a progressive and usually deadly disease of unknown etiology and uncertain pathogenesis. In the last years, a number of metalloproteases have been implicated in its pathogenesis not only through extracellular matrix remodeling but also in the abnormal behavior of lung cells [23–25]. However, studies with other proteases are scanty.



**Fig 7. TMPRSS4 deficiency attenuates bleomycin-induced lung damage in mice.** Wildtype (WT), TMPRSS4 deficient (KO) and haplodeficient (HT) mice were instilled intratracheally with bleomycin (7 U/Kg) or saline solution and studied at 28 days. Panel A: control mice instilled with saline solution. Panel B: mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Histopathologic analysis was performed using hematoxylin and Masson trichrome staining.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192953.g007>

Type II transmembrane serine proteases comprises four subfamilies: (a) matriptase, (b) heparin/transmembrane protease/serine (TMPRSS), (c) human airway trypsin-like (HAT)/differentially expressed in squamous cell carcinoma (DESC), and (d) corin [26].

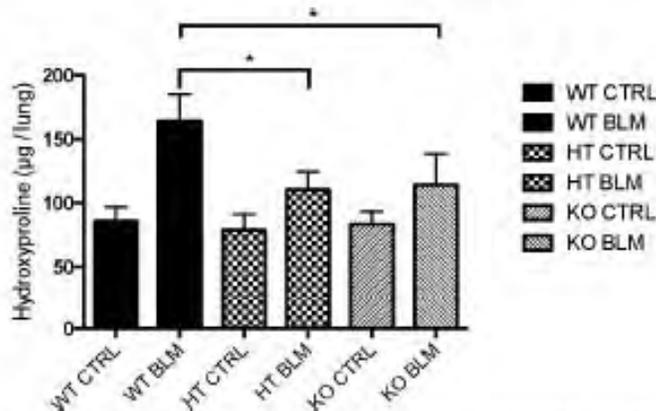
Recently, it was revealed that the expression and activity of matriptase was up-regulated in IPF, affecting primarily the behavior of fibroblasts promoting their activation, proliferation, and migration [27]. Actually, the analysis of protein expression demonstrated a 2-fold increase of this enzyme in primary human pulmonary fibroblasts derived from IPF tissues compared with those from controls. The study also showed that inhibition of matriptase attenuated pulmonary fibrogenesis *in vivo*.

In our study we evaluated a member of another subfamily of the cell surface trypsin-like serine proteases, TMPRSS4, that in contrast to matriptase still remain orphan in the sense that no functions or substrates are currently known [28]. Most studies until now have focused on its implication in different cancers, where a growing body of evidence indicates that over-

expression of TMPRSS4 among other effects enhances EMT-like process and induces migration [29] two events that has been described to occur in IPF [1,21, 22]. Studies in non-neoplastic diseases are scanty but it has been shown that TMPRSS4 may contribute to influenza virus replication and spread, and that a mutation of this protein causes a novel pediatric neurodegenerative disorder named autosomal recessive cerebral atrophy (ARCA) syndrome [30, 31].

To our knowledge, this is the first study dealing with this serine protease in any fibrotic disorder. We first explored the gene expression and putative localization of this molecule in IPF lungs and we found that TMPRSS4 was up-regulated and expressed mainly by mast cells and alveolar epithelial cells primarily in fibrotic areas of the lungs. In vitro, TMPRSS4 was expressed by bronchial and alveolar epithelial cells, and importantly, was absent in IPF and normal human lung fibroblasts, contrary to what was described with matrixase.

Surprisingly, stimulation of human alveolar epithelial cells with TMPRSS4 provoked a significant increase of the expression of E-cadherin, which was corroborated with epithelial cells obtained from rats. E-cadherin, the major cadherin in epithelial cells, is an important adhesion molecule that mediates tight binding to epithelial cells [32]. This molecule is critical to maintain the tissue structural integrity and among other functions, inhibits cell proliferation [33]. Supporting our data, growth rate was significantly decreased by stimulation with recombinant TMPRSS4. Our data also indicate that TMPRSS4 inhibits EMT induced by TGFβ1. EMT is a process that has been associated with the expansion of the fibroblast population and subsequent fibrosis. However, EMT is not always an all-or-none response but shows a spectrum of intermediary phases and may induce an intermediate phenotype, known as partial EMT state. Importantly, partial EMT can allow the efficient collective migration of cohesive epithelia maintaining their internal organization and in this way accelerate wound healing [34]. For example, partial EMT occurs in adult epidermal wound healing to facilitate the migration of keratinocytes during re-epithelialization accelerating wound closure. Likewise, the club cells in the bronchiole airways undergo a transient EMT program during the regeneration of the bronchiolar epithelium [35]. In this context, inhibiting partial EMT and consequently an appropriate epithelial cell migration, TMPRSS4 could contribute to abnormal fibrotic tissue remodeling after injury. We also observed that TGFβ1 seems to decrease the expression of TMPRSS4 suggesting a negative regulation by this mediator.

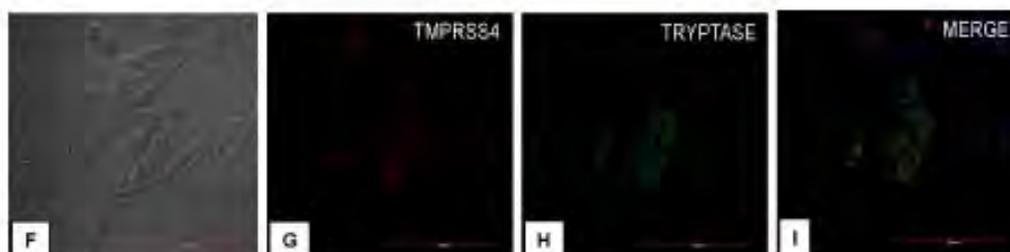
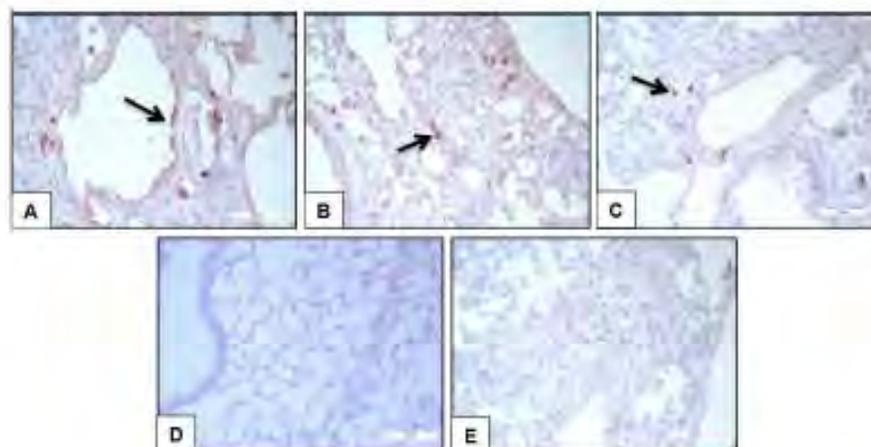


**Fig 8. TMPRSS4 deficiency reduces bleomycin-induced collagen deposition in lungs.** Wildtype (WT), TMPRSS4 deficient (KO) and haploinsufficient (HT) mice were instilled with Bleomycin (7 U/Kg) and studied at 28 days. Collagen content was quantified by hydroxyproline assay. Data are expressed as mean ± SD of 7–12 animals per group. \*  $P < 0.01$  compared with WT instilled animals.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192963.g008>

To determine whether TMPRSS4 is implicated in the development of experimental lung fibrosis, WT and TMPRSS4 (+/-) and (-/-) mice were challenged with bleomycin and the fibrotic response was measured by morphology and collagen content. Our data revealed an important role for TMPRSS4 in promoting bleomycin-induced pulmonary fibrosis since while a strong fibrosis was observed in the WT, a relatively modest increase in collagen deposition and preserved lung architecture was noticed in TMPRSS4 heterozygous and deficient mice after administration of bleomycin. Interestingly, we do not observe a gene-dose effect. There are several examples in the literature demonstrating that in some cases haploinsufficient mice behave very similar to completely deficient mice indicating a dominant effect of the haploinsufficiency [36, 37]. Similar to IPF, in the mouse model of lung fibrosis TMPRSS4 was also observed in epithelial cells and more strongly in mast cells.

The putative profibrotic mechanisms of TMPRSS4 however, are uncertain. Interestingly, strong signal was found in mast cells (MC) which are usually markedly increased in the fibrotic areas of lungs from patients with IPF [38]. Activated MCs, are usually found in close proximity to fibroblast foci and alveolar type II cells where they may release numerous mediators



**Fig 9. TMPRSS4 is expressed by epithelial and mast cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis.** Representative photomicrographs of immunohistochemical staining performed with antibody against TMPRSS4 in lung tissue sections from WT mice injured with bleomycin. The immunoreactive enzyme was observed in epithelia (panel A, black arrow) and interstitial cells (panels B and C, black arrows). Panel D: no positive staining was detected in normal lungs. Panel E shows the negative control where the specific antibody was omitted. All sections were counterstained with hematoxylin. Panels F-I: Representative images of immunofluorescence staining performed with specific antibodies against TMPRSS4 and tryptase. Tissues were stained for TMPRSS4 (Dylight-549, red) and tryptase (AF-488, green). The colocalization of TMPRSS4 and tryptase was determined by fluorescence microscopy and images were merged to resolve the co-localization of these proteins.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192963.g009>

including a variety of proteases and cytokines that exert profibrotic activity [38]. Human lung mast cells have granules with distinct protease content, and have been classified as mast cells containing either tryptase only (MC<sub>T</sub>), chymase only (MC<sub>C</sub>) or both tryptase and chymase (MC<sub>TC</sub>) in their granules. These subtypes may change their phenotypes according modifications of the microenvironment [39]. In IPF, we have previously found a marked increase of TGF- $\beta$  expression primarily in MC<sub>TC</sub> located in small airways and alveolar parenchyma [40]. In the present study, we found by using confocal microscopy, that all these subtypes of mast cells express TMPRSS4 suggesting that this serine protease may be one of the profibrotic molecules expressed by these cells. However, how this enzyme modifies the behavior of mast cells is presently unknown. In addition, although weaker than in mast cells, TMPRSS4 was also found in lung epithelial cells that are critical for the development of IPF [1].

## Conclusions

Our results demonstrated by the first time that the cell surface trypsin-like serine protease TMPRSS4 is upregulated in IPF lungs and that the fibrotic response to bleomycin is attenuated in TMPRSS4-deficient mice suggesting a profibrotic role for this protease. However, further research is necessary to determine the mechanisms by which this enzyme contributes to enhance the lung fibrotic response.

## Supporting information

**S1 Table. Demographic and functional data of IPF and HP patients.**  
(XLSX)

## Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of Ana Valero-Jiménez to obtain the PhD "Doctor en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biológicas", Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Ana Valero-Jiménez, Joaquín Zúñiga, Annie Pardo, Moisés Selman.

**Formal analysis:** Ana Valero-Jiménez, Joaquín Zúñiga, Ivette Buendía-Roldán, Annie Pardo, Moisés Selman.

**Investigation:** Ana Valero-Jiménez, Joaquín Zúñiga, José Cisneros, Carina Becerril, Alfonso Salgado, Marco Checa, Criselda Mendoza-Milla, Miguel Gaxiola, Annie Pardo, Moisés Selman.

**Methodology:** Ana Valero-Jiménez, José Cisneros, Carina Becerril, Alfonso Salgado, Marco Checa, Ivette Buendía-Roldán, Criselda Mendoza-Milla, Miguel Gaxiola.

**Supervision:** Moisés Selman.

**Writing – original draft:** Ana Valero-Jiménez, Joaquín Zúñiga, Annie Pardo, Moisés Selman.

**Writing – review & editing:** Ivette Buendía-Roldán, Moisés Selman.

## References

1. King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011; 378:1949–1961. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4) PMID: 21719092

2. Raghu G, Colford HF, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al; 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.
3. Selman M, King TE, Pardo A: Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*. 2001; 134:136–151. PMID: [11177316](#)
4. 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; 189:1161–1172. <https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2221PP> PMID: [24641682](#)
5. López-Otin C, Bond J. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *J Biol Chem*. 2008; 283:30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200> PMID: [18650443](#)
6. Qiu D, Owen K, Gray K, Bass R, Ellis V. Roles and regulation of membrane-associated serine proteases. *Biochemical Society Transactions*. 2007; 35:583–587. <https://doi.org/10.1042/BST0350583> PMID: [17511657](#)
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. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0343-6> PMID: [26944412](#)
8. Puente XS, Sanchez LM, Gullerrez-Fernandez A, Velasco G, Lopez-Otin C. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33: 331–334. <https://doi.org/10.1042/BST0330331> PMID: [15787589](#)
9. Hooper J, Clements J, Quigley J, Antalis T. Type II Transmembrane Serine Proteases: Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J Biol Chem*. 2001; 276:857–860. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000020200> PMID: [11060317](#)
10. Szabo R, Wu Q, Dickson R, Netzel-Arnett S, Antalis T, Bugge T. Type II transmembrane serine proteases. *Thromb Haemostas*. 2003; 90: 185–193.
11. Netzel-Arnett S, Hooper J, Szabo R, Madison E, Quigley J, Bugge T et al. Membrane anchored serine proteases: A rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2003; 22:237–258. PMID: [12784999](#)
12. Choi SY, Shin HC, Kim SY, Park YW. Role of TMPRSS4 during cancer progression. *Drug News Perspect*. 2008; 21:417–429. <https://doi.org/10.1358/dnp.2008.21.8.1272135> PMID: [19034347](#)
13. Jung H, Lee K, Park S, Park J, Yang Y, Choi S-Y et al. TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2008; 27:2635–2647. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.121> PMID: [17968309](#)
14. Li T, et al. Radiation enhances long-term metastasis potential of residual hepatocellular carcinoma in nude mice through TMPRSS4-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Gene Ther*. 2011; 18:617–626. <https://doi.org/10.1038/cgt.2011.29> PMID: [21637307](#)
15. Min H-J, et al. TMPRSS4 upregulates uPA gene expression through JNK signaling activation to induce cancer cell invasion. *Cellular Signalling*. 2014; 26: 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.002> PMID: [23878400](#)
16. Zeng P, Zhang P, Zhou LN, Tang M, Shen YX, Jin J, et al. TMPRSS4 as an emerging potential poor prognostic factor for solid tumours: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016; 7:76327–76336. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10153> PMID: [27344186](#)
17. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becenti C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*. 2005; 2: e251. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020251> PMID: [16128620](#)
18. Pardo A, Ruiz V, Amado JL, Ramirez R, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Barrios R, Kala SV, Lieberman MW, Selman M. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyltranspeptidase-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167:925–932. <https://doi.org/10.1164/rccm.200209-1007OC> PMID: [12498449](#)
19. Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophys*. 1961; 93:440–447.
20. Lee Y, Ko D, Min HJ, Kim SB, Ahn HM, Lee Y, Kim S. TMPRSS4 induces invasion and proliferation of prostate cancer cells through induction of Slug and cyclin D1. *Oncotarget*. 2016; 7:50315–50332. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10382> PMID: [27385083](#)
21. Kim KK, Kugler MC, Walters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:13180–13185. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605989103> PMID: [16924102](#)

22. Yamaguchi M, Hira S, Tanaka Y, Sumi T, Miyajima M, Mishina T, et al. Fibroblastic foci, covered with alveolar epithelia exhibiting epithelial-mesenchymal transition, destroy alveolar septa by disrupting blood flow in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lab Invest*. 2017; 97:232–242. <https://doi.org/10.1039/labinvest.2016.135> PMID: 27941755
23. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al. Gene expression analysis reveals matrixin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:6292–6297. <https://doi.org/10.1073/pnas.092134099> PMID: 11983918
24. Herrera I, Cisneros J, Maldonado M, Ramirez R, Ortiz-Quintero B, Anso E, et al. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459794> PMID: 23902766
25. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis: A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279:L562–574. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.3.L562> PMID: 10946632
26. Tanabe LM, Lili K. The role of type II transmembrane serine protease-mediated signaling in cancer. *FEBS J*. 2017; 284:1421–1436. <https://doi.org/10.1111/febs.13971> PMID: 27870933
27. Bardou O, Menou A, François C, Dultman JW, von der Thüsen JH, Boute R, et al. Membrane-anchored Serine Protease Matriptase Is a Trigger of Pulmonary Fibrogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018; 198:847–860. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.201502-0299OC> PMID: 28589507
28. Szabo R, Bugge TH. Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011; 27:213–235. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092810-154247> PMID: 21721945
29. Kim S, Lee JW. Membrane proteins involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor invasion: studies on TMPRSS4 and TM4SF5. *Genomics Inform*. 2014; 12:12–20. <https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.1.12> PMID: 24748857
30. Bertam S, Glowacka I, Blazejewska P, Solieux E, Allen P, Danisch S, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate tyrosin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J Virol*. 2010; 84:10016–10025. <https://doi.org/10.1128/JVI.00239-10> PMID: 20631123
31. Lahiry P, Racadio L, Wang J, Robinson JF, Gloor GB, Rupa CA, et al. A mutation in the serine protease TMPRSS4 in a novel pediatric neurodegenerative disorder. *Orphanet J Rare Dis*. 2013; 8:126. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-126> PMID: 23957963
32. Hiroheshi S. Inactivation of the E-Cadherin-Mediated Cell Adhesion System in Human Cancers. *Am J Pathol*. 1998; 153:333–339. [https://doi.org/10.1016/S0020-9140\(10\)65575-7](https://doi.org/10.1016/S0020-9140(10)65575-7) PMID: 9708792
33. Wu X, Zhuang YX, Hong CQ, Chen JY, You YJ, Zhang F, Huang P, Wu MY. Clinical importance and therapeutic implication of E-cadherin gene methylation in human ovarian cancer. *Med Oncol*. 2014; 31:100. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0100-y> PMID: 24979953
34. Revenu C, Gilmour D. EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration. *Curr Opin Genet Dev*. 2009; 19:338–342. <https://doi.org/10.1016/j.cogd.2009.04.007> PMID: 19464192
35. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016; 168:21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.029> PMID: 27368099
36. Short SP, Kondo J, Smalley-Freed WG, Takeda H, Dohn MR, Powell AE, Carnahan RH, Washington MK, Tipton M, Payne DM, Jenkins NA, Copeland NG, Coffey RJ, Reynolds AB p120-Catenin is an obligate haploinsufficient tumor suppressor in intestinal neoplasia. *J Clin Invest*. 2017 Nov 13. pii: 77217. <https://doi.org/10.1172/JCI77217> PMID: 29130932
37. Afshari P, Yao WD, Middleton FA. Reduced Sic1a1 expression is associated with neuroinflammation and impaired sensorimotor gating and cognitive performance in mice: Implications for schizophrenia. *PLoS One*. 2017; 12(9):e0183854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183854> PMID: 28849095
38. Wysocka M, Dahal BK, Kosanovic D, Petersen F, Taborski B, von Gontsch S, et al. Mast cells and fibroblasts work in concert to aggravate pulmonary fibrosis: role of transmembrane SCF and the PAR-2/PKC- $\alpha$ /Raf-1/p44/42 signaling pathway. *Am J Pathol*. 2013; 182:2094–2108. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.013> PMID: 23592441
39. Cruse G, Brackling P. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. *Eur J Pharmacol*. 2016; 778:125–138. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.046> PMID: 25959396
40. Andersson CK, Andersson-Sjölund A, Mori M, Hallgren O, Pardo A, Eriksson L, et al. Activated MCTC mast cells infiltrate diseased lung areas in cystic fibrosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2011; 12:139. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-139> PMID: 22014187