



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE LA METALOPROTEINASA DE MATRIZ ASOCIADA
A MEMBRANA TIPO-1 (MT1-MMP) EN LA FIBROSIS
PULMONAR.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
M. en C. LUIS ANTONIO PLÁCIDO MÉNDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO SEMO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA.

COMITÉ TUTOR: DRA MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.,

AGOSTO 2023.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE LA METALOPROTEINASA DE MATRIZ ASOCIADA
A MEMBRANA TIPO-1 (MT1-MMP) EN LA FIBROSIS
PULMONAR.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
M. en C. LUIS ANTONIO PLÁCIDO MÉNDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO SEMO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA.

COMITÉ TUTOR: DRA MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.,

AGOSTO2023.



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/218/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité de Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de noviembre de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **PLÁCIDO MÉNDEZ LUIS ANTONIO** con número de cuenta **302300439** con la tesis titulada: **"PAPEL DE LA METALOPROTEINASA DE MATRIZ ASOCIADA A MEMBRANA TIPO-1 (MT1-MMP) EN LA FIBROSIS PULMONAR"**, realizada bajo la dirección del **DRA. ANNIE PARDO CEMO**:

| | |
|-------------|--|
| Presidente: | DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA Y HAZAS |
| Vocal: | DR. CARLOS RAMOS ABRAHAM |
| Vocal: | DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA |
| Vocal: | DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA |
| Secretario: | DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS |

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 08 de mayo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM la aprobación para el desarrollo de esta tesis de doctorado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis con el número de beca 245558.

Agradezco a la Dra. Annie Pardo Semo, a la Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas y a la Dra. María de Lourdes Segura Valdez, miembros del Comité Tutor, la aprobación de este proyecto, así como sus comentarios y sugerencias para su enriquecimiento y realización durante estos años.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL.

A Amaury Mikael, por ser ese pequeño motor super revolucionado que me levanta todos los días, cargado con la energía para seguir adelante, gracias por estos años de felicidad infinita. Te amo

A mi papá Mauricio Plácido, de verdad no tienes idea como estoy agradecido con la vida por el padre tan maravilloso que me dio, gracias por sacarme adelante siempre. Sin ti, estas metas nunca las hubiera cumplido.

A mi mamá Graciela Méndez que desde el cielo me llevas cuidando ya tantos años.

A mis hermanos los Babus Selene y Mauricio y sus hijos Tachuy y mini Mau gracias por todo su apoyo, platicas, consejos, chistes, juegos y enseñanzas, de verdad no saben como amo estar con ustedes.

A mis tíos y primos Plácido y Méndez.

A mis amigos/ hermanos desde la secundaria Zenit, Blanca, Juan, Karloz, Miguel, Jesús y Sofy. Gracias por escuchar y por todas esas grandes aventuras.

A mis amigos de los laboratorios de Ciencias y el INER: Miguel Vacacha, Fernanda, Fany, Marco, Mariel, Rubí, Miguel Durango, Miguel Cid, Yire, Pablo, Yahir, David y Ángeles. Gracias por su bella amistad en el laboratorio y fuera de el.

A mis compañeros y amigos de trabajo Caglos, Bere, Raúl, Ivonne y Edgar, por apoyarme y echarme ánimos al escribir esta tesis.

Al Centro Universitario México (CUM), por esta gran oportunidad de crecimiento personal y laboral.

Al Dr. Carlos Ramos por su apoyo incondicional y desinteresado cuando más lo necesitaba.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, con especial cariño a los laboratorios de Fibrosis Pulmonar y Biología Molecular, así como el Bioterio.

Y sobre todo a los ratoncitos utilizados en este proyecto.

ABREVIATURAS:

ATP: Adenosín trifosfato

CEA: Célula epitelial alveolar

CO₂: Dióxido de carbono

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

EGFR: Factor de crecimiento epitelial

EPID: Enfermedades pulmonares intersticiales difusas

FPI: Fibrosis pulmonar idiopática

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

HTF-4: Factor de transcripción hélice 4

IGFBP3 Factor de crecimiento de unión a proteína tipo insulina 3

JNK1: Proteína quinasa 1 c-Jun N-terminal

LBA: Lavado bronquio alveolar

MEC: Matriz extracelular

MLE: Células epiteliales de pulmón de ratón

MMP: Metaloproteinasa

MT-MMP: Metaloproteinasa asociada a membrana

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción

SFTPC: Proteína surfactante C

SA β -Gal: Marcador de asociado a senescencia β -galactosidasa

shRNA: RNA de horquilla corto

SMARCA4: Regulador de cromatina dependiente de actina asociado a matriz, subfamilia A

TEM: Transición epitelio mesénquima

TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteinasas

TG: Transgénico

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta uno

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- alfa

TRF1: Factor de unión repetida telomérica 1

Zn: Zinc

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Introducción..... | 3 |
| Matriz extracelular..... | 11 |
| Estructura de las MMPs..... | 13 |
| Activación de MMPs..... | 17 |
| MMP14..... | 23 |
| Ratón Mmp14KO..... | 26 |
| MMP14 es esencial para la alveolarización..... | 27 |
| MMP14 y EMT..... | 27 |
| MMP14 y migración de fibroblastos..... | 28 |
| Justificación..... | 29 |
| Objetivos..... | 30 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 30 |
| RESULTADOS..... | 37 |
| Generación de ratón condicional de Mmp14..... | 38 |
| Modelo de fibrosis pulmonar por bleomicina..... | 43 |
| Transfección de MMP14 en células A549..... | 48 |
| Las células epiteliales shMMP14 sobre expresan TGF- β e incrementan marcadores profibróticos en fibroblastos..... | 53 |
| Discusión..... | 55 |
| Conclusiones..... | 60 |
| Referencias bibliográficas..... | 61 |
| Anexo..... | 75 |

Resumen.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad de etiología desconocida, crónica, progresiva y letal asociada al envejecimiento, que se caracteriza por una activación aberrante de las células epiteliales alveolares, mismas que inducen la proliferación y activación de las poblaciones de fibroblastos y miofibroblastos que resulta en la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular y la pérdida de la arquitectura y la función pulmonar.

Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado en pacientes con FPI la sobreexpresión de algunas metaloproteasas de matriz (MMPs), entre ellas la MMP14, enzima que localiza principalmente en las células del epitelio pulmonar; sin embargo, el papel de esta metaloproteasa de membrana no ha sido esclarecido.

En este trabajo, se exploró el papel de la *Mmp14* en fibrosis pulmonar experimental inducida por bleomicina utilizando un modelo de ratón condicional en donde específicamente en el epitelio alveolar pulmonar se eliminó genéticamente la MMP14. Nuestros resultados muestran que la deficiencia de *Mmp14* epitelial en ratones incrementa la severidad y extensión de la fibrosis y afecta la resolución de las lesiones. Experimentos de ganancia y pérdida de función utilizando la línea celular A549 demostraron que las células con deficiencia de MMP14 mostraron un aumento de marcadores asociados a senescencia que incluyen SA β -Gal, p21 y el marcador de daño a DNA γ -H2AX. Asimismo, el medio condicionado de estas células aumentó la expresión de moléculas asociadas a fibrosis. Estos hallazgos sugieren un nuevo mecanismo anti-fibrótico de la MMP14 asociado con una actividad anti-senescente y consecuentemente su ausencia resulta en una deficiente reparación del pulmón. El aumento de MMP14 que se observa en FPI puede representar un mecanismo anti-fibrótico que es rebasado por un fuerte microambiente profibrótico característico de esta enfermedad.

Abstract.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a disease of unknown, chronic, progressive and lethal etiology associated with aging, characterized by aberrant activation of alveolar epithelial cells, which induce proliferation and activation of fibroblast and myofibroblast populations resulting in excessive accumulation of extracellular matrix components and loss of lung architecture and function.

Previous studies in our laboratory have shown in patients with IPF the overexpression of some matrix metalloproteases (MMPs), among them MMP14, an enzyme that mainly localizes mainly in the cells of the pulmonary epithelium; however, the role of this membrane metalloprotease has not been elucidated.

In this work, the role of Mmp14 in bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis was explored using a conditional mouse model where MMP14 was genetically eliminated specifically in the pulmonary alveolar epithelium. Our results show that epithelial Mmp14 deficiency in mice increases the severity and extent of fibrosis, in addition to affecting its resolution. Our results show that epithelial Mmp14 deficiency in mice increases the severity and extent of fibrosis and extent of fibrosis and affects the resolution of lesions. Gain and loss function experiments using that A549 cell line demonstrated that MMP14 deficient mice cells showed an increase in senescence associated markers including SA β -Gal, p21 and the DNA damage marker γ -H2AX. Likewise, the conditioned medium of these cells increased the expression of molecules associated with fibrosis. These findings suggest a new anti-fibrotic mechanism of MMP14 associated with an anti-senescent activity and consequently its absence results in deficient lung repair. The increase in MMP14 observed in IPF may represent an anti-fibrotic mechanism that is overcome by a strong profibrotic microenvironment characteristic of this disease.

Introducción.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una patología que pertenece a un amplio y heterogéneo grupo de padecimientos que afectan el parénquima pulmonar, conocidos como enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID). (1,2) La FPI es una enfermedad letal progresiva e irreversible, asociada al envejecimiento, y se caracteriza por la acumulación excesiva en los espacios intersticiales y alveolares de moléculas de la matriz extracelular, especialmente colágenas fibrilares, así como por el rompimiento de las membranas basales y la presencia de focos de fibroblastos y miofibroblastos en el parénquima pulmonar, lo que conlleva a la pérdida de la arquitectura y función del pulmón (3,4,5).

Las EPID son un conjunto variado de entidades clínico-patológicas que presentan síntomas parecidos entre sí, en los que se observa menor volumen pulmonar debido a una alteración en el parénquima pulmonar que lleva a menor volumen pulmonar debido a una alteración en el parénquima pulmonar teniendo un efecto negativo en el equilibrio entre ventilación y perfusión (5). En los análisis espirométricos es común encontrar disminución de capacidad pulmonar total, capacidad vital forzada, capacidad de transferencia de CO₂. Incluyen más de 150 padecimientos diferentes cuya etiología es conocida solo en el 30% de ellos. Entre las causas se encuentran ciertos medicamentos, partículas orgánicas e inorgánicas, procesos autoinmunes, sarcoidosis y vasculitis (6,7).

Las EPID se dividen en 2 categorías; Neumonía infiltrativa difusa, con una presencia histológica específica de causa conocida. Estas EPID de causa conocida pueden ser provocadas por la inhalación de partículas inorgánicas como asbesto, sílice y partículas de metal o madera, así como aquellas provocadas por la inhalación de partículas orgánicas como antígeno aviario y hongos (7,8,9), además del uso de radiación y algunos medicamentos quimioterapéuticos como la bleomicina, la cual produce fibrosis pulmonar de forma dosis dependiente. Este compuesto se utiliza en el modelo experimental de fibrosis pulmonar, ya que la instilación intratraqueal de bleomicina es utilizada en la investigación básica como un importante agente fibrógeno en modelos animales, debido a la presencia y distribución de las

lesiones que puede asemejarse a ciertas neumonías intersticiales (9,10,11).

En cuanto a las EPID de etiología desconocida o también denominadas idiopáticas, como su nombre lo dice, no se conoce la causa exacta de estas. Dentro de este último grupo la más agresiva es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la cual se caracteriza por ser una enfermedad pulmonar implacablemente progresiva y devastadora (12, 13, 14). Una característica de la FPI es la pérdida de la arquitectura normal del pulmón, teniendo como resultado final, una irreversible y progresiva insuficiencia respiratoria, misma que termina siendo letal en un lapso de tiempo relativamente corto, incluso menor a varios tipos de cáncer, con una sobrevivencia de 2-3 años después del diagnóstico (15,16). La FPI tiene una mayor presencia en hombres que en mujeres y con mayor incidencia en adultos con una edad media de 60 años. Por lo que el envejecimiento es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de FPI (11, 16).

Tradicionalmente la FPI se trataba como una enfermedad que provenía de un proceso inflamatorio no resuelto como es el caso de la gran mayoría de los procesos fibróticos. Sin embargo, existe fuerte evidencia clínica y experimental la FPI es causada por un desorden epitelial, mismo que es resultado de la interacción entre la predisposición genética del individuo y otros factores de riesgo como, fumar, inhalación partículas de madera o metal. Diferentes modelos en ratones transgénicos deficientes de genes ligados al proceso inflamatorio demuestran que es posible una respuesta fibrótica en ausencia de un proceso inflamatorio (11,13,16,17). Actualmente es ampliamente aceptada la hipótesis de que la FPI es una enfermedad que comienza con un daño en el epitelio alveolar, lo que desemboca en una respuesta aberrante de las células epiteliales en el mecanismo de reparación de la lesión, provocando la migración, proliferación y activación de las células mesenquimales, además de la formación de focos de fibroblastos y miofibroblastos, teniendo como resultado final la acumulación excesiva de matriz extracelular y la destrucción irreversible de la arquitectura del parénquima pulmonar (2,13,17) (Figura 1).

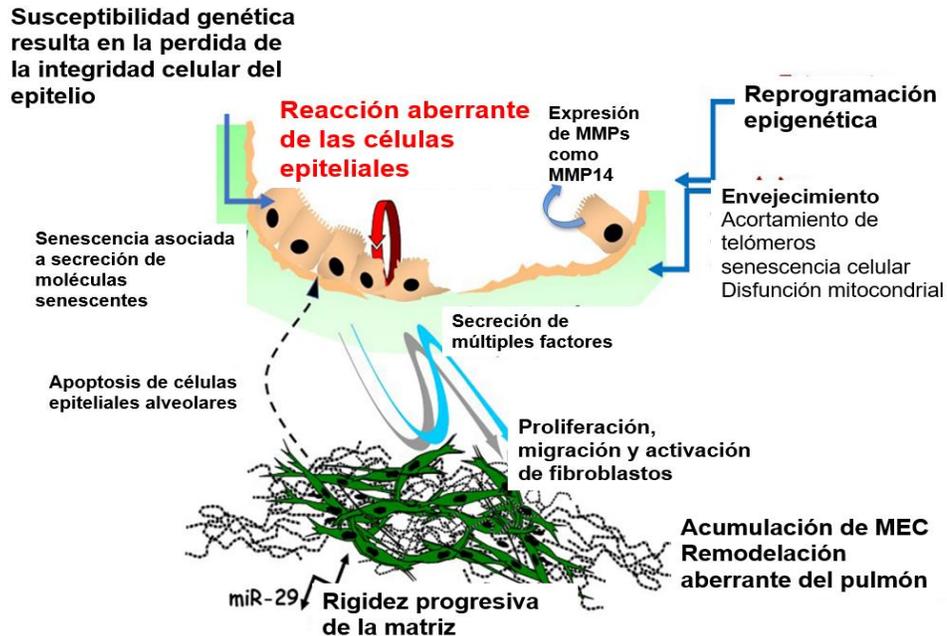


Figura 1. Esquema del modelo de reparación anormal del daño en la FPI. Tomado y traducido de Selman M, Pardo A. Am J Respir Crit Care Med (2014).

Epitelio Alveolar pulmonar

El epitelio alveolar pulmonar comprende dos tipos de células epiteliales alveolares, llamadas neumocitos tipo I y tipo II (o células alveolares tipo I y tipo II), siendo las células alveolares tipo II más numerosas que el tipo I (Figura 2). En un pulmón humano adulto el área de recubrimiento de las células alveolares tipo I y II es aproximadamente de 150m², de los cuales las tipo I ocupan el 90% de la superficie alveolar debido a su estructura aplanada y alargada, además de ser los encargados del intercambio gaseoso (9,18) (Figura 2).

Las células alveolares tipo II se caracterizan por sintetizar el surfactante, el cual reduce de manera significativa la tensión superficial dentro del alveolo pulmonar, previniendo su colapso durante la respiración, además de tener otras funciones importantes como la respuesta inmunológica (18). El surfactante es un complejo conformado por fosfolípidos en un 85% y por proteínas en un 15%. Los fosfolípidos presentes en el surfactante son: la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina insaturada, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol. De todos éstos, la DPPC, por sí sola,

tiene las propiedades de reducir la tensión superficial alveolar, pero requiere de las proteínas de surfactante y otros lípidos para facilitar su adsorción en la interfase aire líquido (19,20).

Las células alveolares tipo II son de forma cubica y con microvellosidades apicales de un tamaño pequeño en comparación a la longitud de las células alveolares tipo I. se localizan habitualmente en los ángulos de los alveolos, a nivel de los septos, por lo que también se les conoce como células septales. Dentro de su citoplasma contiene un gran número de mitocondrias y cuerpos laminares unidos a la membrana, los cuales son los gránulos secretores del surfactante y microscópicamente son su característica más distintiva (21,22).

Por otro lado, las células alveolares tipo II juegan un papel central en la reparación alveolar, ya que son progenitores de las células alveolares tipo I y, por lo tanto, son los responsables de la reparación alveolar después de algún daño al epitelio alveolar (Figura 2). En condiciones normales, la reparación del epitelio alveolar se produce a través de la proliferación de los neumocitos tipo II y su posterior diferenciación a neumocitos tipo I (20,21,22).

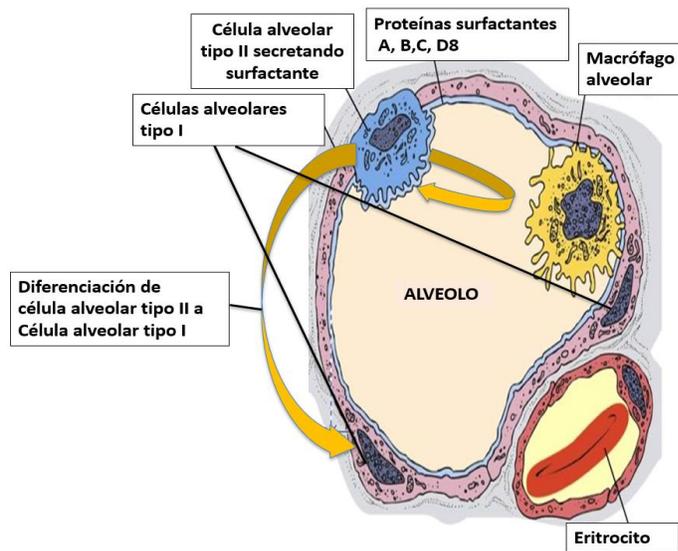


Figura 2. Esquema de alveolo pulmonar. Estructura del alveolo, así como el acomodo de las células alveolares epiteliales tipo I y II, y la capa del surfactante que

evita el colapso del alveolo. También se esquematiza que las células alveolares tipo II al diferenciarse dan origen al tipo I. Tomado y modificado de Zander S. Dani patología pulmonar 2da edición (2018)

Epitelio alveolar pulmonar y Fibrosis

Tomando en consideración que en la FPI hay un daño epitelial, seguido de una reparación aberrante del epitelio alveolar, que provoca la migración, proliferación y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, que resulta en la acumulación excesiva de moléculas de la MEC en el espacio alveolar provocando la muerte de las células epiteliales y por lo tanto una pérdida de la arquitectura y función del pulmón (13,17).

Existen numerosos estudios que demuestran la activación anormal del epitelio bronquial y alveolar al expresar la mayoría de los factores de crecimiento y citosinas responsables de la migración, proliferación y activación de fibroblastos, además de la activación de vías de señalización que solo se encuentran encendidas durante el desarrollo embrionario (23,24). Uno de los factores que podemos encontrar es el TGF- β 1 (Factor de crecimiento transformante beta uno β 1), una de las moléculas más estudiadas en la fibrosis pulmonar, pues juega un papel central en el desarrollo de esta patología, ya que se ha demostrado que promueve la apoptosis del epitelio alveolar, activación y proliferación de fibroblastos, así como su diferenciación a miofibroblastos y la síntesis de colágena (24). El TGF- β 1 es secretado en forma latente y almacenado en la matriz extracelular, por lo que la misma matriz funciona como un reservorio de esta molécula, la cual es liberada al degradarse esta matriz. La activación de TGF- β 1 depende la interacción con integrinas de la superficie celular, por ejemplo, la integrina α β 6, la cual es altamente expresada en epitelio alveolar dañado además de fibroblastos, que en conjunto potencian desarrollo de la fibrosis pulmonar (25). Entre los procesos promovidos por el TGF- β 1 podemos mencionar a la transición epitelio mesénquima (TEM), un fenómeno en el que las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal, pero no solo morfológicamente, sino también sintetizando moléculas características de las células mesenquimales (25,26,27). Se tiene documentado que las células de

epitelio dañado sintetizan PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) un poderoso quimio atrayente, el cual es capaz de generar la migración de fibroblastos y fibrocitos circulantes y por lo tanto un acumulamiento de moléculas de la matriz extracelular (27,28). Por lo que las células epiteliales pueden contribuir a la expansión de la población de fibroblastos y miofibroblastos, recapitulando vías del desarrollo embrionario, sintetizando quimio atrayentes y moléculas que induzcan la proliferación y diferenciación de fibroblastos o por la TEM. (27,29)

Existe numerosa evidencia tanto *in vitro* como *in vivo* que sostiene la hipótesis de King, Pardo, Selman, pues en ratones transgénicos la ausencia o disminución en algunas moléculas de gran importancia para el desarrollo y la homeostasis alveolar pueden causar fibrosis pulmonar, sin pasar necesariamente por un proceso inflamatorio, tal es el caso del ratón deficiente de Shp2, un potente inductor de la morfogénesis bronquial y alveolarización durante el desarrollo embrionario. Este ratón presenta una fibrosis espontánea, ya que no es antecedida por un proceso inflamatorio, ni ningún otro factor externo, más que la ausencia de dicha molécula (28).

Estudios recientes han demostrado que mutaciones en la proteína surfactante C están altamente relacionadas con la fibrosis pulmonar familiar, además de que en un ratón deficiente de esta proteína observaron un incremento en el número de fibroblastos después de ser instilados con bleomicina, presentando una excesiva acumulación de colágena y una evidente distorsión del parénquima pulmonar, además de presentar una deficiente resolución de la fibrosis (29). Dos ejemplos de esto son las mutaciones del gen de la proteína surfactante C en ratones transgénicos las cuales se relacionan con la fibrosis espontánea. Estudios *in vitro* del gen de la proteína surfactante C (SFTPC) demostraron que al presentar una mutación en una cisteína en el codón 121 (C121G) induce estrés de retículo endoplásmico, esta misma mutación al ser inducida en un ratón adulto provoca una fibrosis pulmonar espontánea después de una alveolitis resuelta (30). Observaciones similares se presentaron en el ratón Sftpc (SP-CI73T), el cual presenta una sustitución de isoleucina por treonina en el codón 73, la cual también

causa una fibrosis pulmonar espontanea en ratones adultos (31).

Algunas investigaciones sugieren que la fibrogénesis que ocurre en la FPI es un proceso dinámico en el que interaccionan células epiteliales, fibroblastos, células del sistema inmune como macrófagos y células T, además de células endoteliales (32,33). Sin embargo, existe una gran cantidad de evidencia que demuestra que la fibrosis pulmonar es causada por el agotamiento los neumocitos tipo II debido a micro lesiones repetitivas (34,35). Por ejemplo, Sisson y colaboradores, demostraron en un modelo animal, que eliminando de manera dirigida a los neumocitos tipo II es causa suficiente para inducir fibrosis pulmonar (36).

Se tiene reportado que la vía JNK1 (proteína quinasa 1 c-Jun N-terminal) está activa en neumocitos tipo I y II en pacientes con IPF, mientras que, en pacientes sanos, esta no está activa. Por lo que se montaron dos modelos murinos de fibrosis inducida por bleomicina y otro por medio de un adenovirus de TGF- β 1, donde se observó que al inhibir la vía JNK-1 en los neumocitos, había una disminución de fibrosis y contenido de colágena en ambos modelos, además de que las células epiteliales disminuyeron los genes y proteínas mesenquimales, conservando la expresión de genes epiteliales evitando la TEM (37).

El SMARCA4 (Regulador de cromatina dependiente de actina asociado a matriz, subfamilia A) es parte de un gran complejo de remodelación de cromatina dependiente de ATP, el cual se encuentra altamente expresado en el modelo murino de fibrosis pulmonar, especialmente en las células alveolares tipo II, sin embargo cuando este gen se bloquea específicamente en este tipo celular en un ratón condicional , los ratones tienen una fibrosis más agresiva en comparación con los silvestres o wild type (WT), así como una menor tasa de proliferación de estas células tanto *in vivo* como *in vitro*, (38).

La reticulocalbina 3, una proteína de retículo endoplásmico que participa en la maduración de las células alveolares tipo II durante el desarrollo perinatal del pulmón, pero que no se conoce su rol biológico en el pulmón adulto; sin embargo, se encuentra altamente expresada en células alveolares tipo II en la fibrosis

pulmonar. Por lo que se generó un ratón condicional de esta proteína, al que se le indujo fibrosis pulmonar. Presentando un alto grado de fibrosis y apoptosis en las células alveolares y estrés de retículo endoplásmico tanto *in vivo* como *in vitro* (39).

FPI y envejecimiento

Investigaciones epidemiológicas han demostrado que la FPI comúnmente ocurre en adultos en un rango de edad cercano a los 60 años, indicando que el envejecimiento puede ser uno de los mayores factores de riesgo a la patogénesis de FPI.

El envejecimiento puede definirse como un proceso fisiológico natural caracterizado por la disminución de la capacidad de homeostasis y de regulación de funciones apropiadas en respuesta a un daño (40, 41).

Se han propuesto nueve características del envejecimiento que incluyen: Inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, alteraciones en censar nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células madre, comunicación celular alterada (42).

En FPI están presentes casi todas las características del envejecimiento, incluyendo, la disminución de telómeros, el daño mitocondrial, la disminución de la autofagia como parte de la proteostasis, la senescencia celular, que es un proceso fisiológico que recientemente se ha visto activo durante el desarrollo embrionario y placenta (43).

Es interesante señalar que el ratón condicional en el que se eliminó específicamente en células alveolares tipo II la proteína TRF1 (Factor de unión repetida telomérica 1), misma que es esencial para la replicación del ADN, provocó un incremento en el daño de DNA a las dos semanas, sin embargo, a los 9 meses de la deleción se detectó un acortamiento de telómeros en las células alveolares tipo II, además de que un gran número de estas células presentaban marcadores de células

mesenquimales y senescencia asociada a B-galactosidasa, e interesamente los ratones desarrollaron fibrosis espontánea. (44).

Recientemente de observo que células del epitelio alveolar de pacientes con FPI expresaban p21 y p16 co-localizando con E-caderina, indicando un fenotipo senescente en células epiteliales, las cuales se encontraba rodeando focos de fibroblastos. Lo que demuestra que la senescencia es un proceso presente en la FPI (45). La senescencia es un proceso caracterizado por un arresto celular, resistencia a la apoptosis, alta actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia y la secreción citocinas y quimiocinas pro inflamatorias, factores angiogénicos y MMPs que causan cambios en el microambiente local (46). Para evaluar los efectos de la senescencia en la fibrosis pulmonar experimental se instiló a un grupo de ratones con bleomicina, suministrándoles rapamicina, un potente supresor de senescencia, provocando una disminución de la fibrosis pulmonar en estos ratones. Además estudios *in vitro* en células epiteliales de ratón MLE-12 a las que se les indujo senescencia por bleomicina demostraron en un cocultivo con fibroblastos pulmonares ser capaces de inducir la activación de fibroblastos por medio de la vía Wnt, una vía ya reportada como esencial para la activación de fibroblastos incrementando la migración y proliferación de los fibroblastos, así como aumentar la síntesis de colágena tipo I y la expresión de alfa-SMA; efectos que eran abolidos al darles a estas células epiteliales senescentes un tratamiento con rapamicina. (47,48).

Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es una red intrínseca tridimensional de proteínas, altamente dinámica y especializada presente en animales multicelulares. La MEC está compuesta por colágenas, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, quimiocinas y citosinas. Cada uno de estos componentes tienen importantes funciones durante el desarrollo embrionario, homeostasis y algunas patologías. Hasta hace poco, se creía que la MEC era una estructura que sólo funcionaba como una estructura de anclaje y soporte mecánico para las células. Sin embargo, se encuentra lejos de ser

solo eso, pues se sabe que, los componentes de la MEC interactúan con las diferentes células a través de numerosos receptores de la superficie celular. Dentro de estos receptores podemos incluir integrinas, receptores con dominio discoidina, proteoglicanos de la superficie celular entre otros (49). Participando en una gran variedad de procesos como la migración celular, proliferación, diferenciación, y apoptosis, entre otros. Por lo que la MEC está lejos de ser una estructura inerte (46).

La MEC es una estructura dinámica que desempeña un papel clave en la morfofostasis pulmonar. El parénquima pulmonar está compuesto entre otras por colágenas tipo I y III, elastina, proteoglicanos y fibronectina (51); mientras la estructura especializada de la MEC conocida como membrana basal en la que descansan el epitelio alveolar y el endotelio está compuestas por colágena tipo IV, laminina y entactina entre otros (52).

Matriz extracelular y Fibrosis

Actualmente la fibrosis es uno de los grandes retos de la medicina moderna. En especial, porque en ocasiones no se conoce la etiología de esta, sin embargo, se tiene entendido que la fibrosis envuelve procesos celulares tanto intrínsecos como extrínsecos además de mecanismos modulados por la propia MEC. Se tiene reportado el encendido de diferentes vías durante la progresión de la fibrosis, vías que en muchas ocasiones normalmente son activas solo durante el desarrollo embrionario. Por otra parte, los componentes de la MEC desempeñan un papel fundamental en la fibrosis, no solo por el hecho de que, en sí, la fibrosis es la acumulación excesiva de MEC, sino porque estudios recientes demuestran que fragmentos de fibrina y fibronectina son potencialmente fibrogénicos (53). Mas interesante aun, en tejidos decelularizados de pacientes con FPI, los cuales carecen de cualquier otra molécula que no sea MEC, se sembraron fibroblastos, los cuales con solo la presencia de la MEC de FPI comenzaron a diferenciarse en miofibroblastos activos (54). En este contexto, se ha propuesto el concepto de fibroenvejecimiento, es decir, la propensión a desarrollar fibrosis tisular asociada al envejecimiento, y se ha propuesto que la MEC es un actor clave que subyace a este proceso. Durante el envejecimiento, las moléculas de la MEC se dañan a través de

muchas modificaciones que incluyen glicación, reticulación y entrecruzamientos, lo que conduce a una rigidez de la matriz que intensifica las alteraciones asociadas al envejecimiento (55).

Metaloproteinasas de la matriz extracelular

La MEC se encuentra en una constante remodelación necesaria para mantener la integridad y función de los tejidos y órganos y se presenta tanto en condiciones normales así como su alteración en condiciones patológicas. Las metaloproteinasas de la matriz o matrixinas (MMPs) son un grupo de enzimas que pertenecen a una super familia de proteasas llamadas metzincinas y reciben su nombre debido a que su sitio catalítico contiene el metal Zinc (56). Las MMPs son las enzimas encargadas de la regulación de la MEC, ya que son capaces de degradar todas las proteínas de la MEC en condiciones de homeostasis y patológicas, además prácticamente se encuentran en todos los tejidos, pues son secretadas por múltiples tipos celulares, tanto locales como migratorios (57).

Sin embargo, las MMPs no solo funcionan como reguladores de la MEC, ya que además de los sustratos de la MEC son capaces de procesar mediadores bioactivos como factores de crecimiento, citosinas, quimiocinas o receptores de la superficie celular (58). También participan en el inicio de cascadas de señalización otras proteinasas que impactan en muchos otros estratos además de los propios, por lo que son de suma importancia en procesos biológicos como desarrollo embrionario, morfogénesis de órganos, ovulación, dilatación cervical, angiogénesis, ciclo endometrial, remodelación de hueso, migración, diferenciación, proliferación, adhesión y apoptosis celular y otros (3,59,); las MMPs también desempeñan un papel importante en procesos patológicos como artritis, ulceración de los tejidos, cáncer, aneurismas, nefritis, enfermedades cardiovasculares y fibrosis (60,61).

Estructura de las MMPs

Cada MMP tiene un efecto distinto sobre la MEC gracias a su estructura, la cual le confiere distintas características químicas, bioquímicas y morfológicas. Estructuralmente MMPs son un reflejo de la relación y cercanía evolutiva entre ellas

mismas, dada en la conservación de sus dominios y los mecanismos de catálisis y regulación, mismos que tienen efectos únicos en la conducta de la célula, tales como migración, proliferación, apoptosis, morfología, expresión de genes y activación de cascadas intracelulares, las cuales influyen de manera importante en la homeostasis de los tejidos (62,63).

Existen dos tipos de MMPs, las que son secretadas hacia el exterior de la célula y las que se encuentran unidas a la membrana, también conocidas como MT-MMPs (metaloproteinasas tipo membrana). Las MMPs que son secretadas hacia el exterior tienen una conformación que consiste en un péptido señal, un dominio catalítico encargado de la actividad proteolítica, que contiene una secuencia altamente conservada (His-Glu-X-Gli-His) a la cual se encuentra unido el Zn catalítico, además de 2 a 3 iones de Ca y un ion estructural adicional de Zinc. El dominio tipo hemopexina recibe este nombre debido a que consta de 4 secuencias repetidas parecidas a la proteína del mismo nombre, este dominio se conecta con el dominio catalítico por medio de una secuencia rica en prolina denominada bisagra, tanto el dominio hemopexina como la región de bisagra participan en el reconocimiento de la enzima por su sustrato, además de la interacción de la enzima con sus inhibidores. Todas las MMPs, excepto la 7 y la 26, tienen la región de bisagra y el dominio tipo hemopexina (3, 64, 65) (Figura 3).

Las metaloproteinasas de tipo membrana (MT-MMPs) forman un subgrupo dentro de la familia de las MMPs, este subgrupo está conformado por seis miembros, MT1-MMP (MMP14), MT2-MMP (MMP15), MT3-MMP (MMP16), MT4-MMP (MMP17), MT5-MMP (MMP24) y MT6-MMP (MMP26) (66). Las MT-MMPs comparten en su estructura algunos dominios en común, que consiste en un péptido señal, prodominio, dominio catalítico, región tipo bisagra, dominio tipo hemopexina; sin embargo, pueden variar en los dominios con los que interactúan con la membrana, tal es el caso de la MT1, MT2, MT3, MT5-MMP, pues estas contienen un dominio transmembranal un dominio citoplasmático corto. Por otro lado, MT4 y MT6-MMP se unen a la membrana gracias a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Todas las MT-MMPs presentan un motivo de aminoácidos básicos en el extremo carboxilo del

prodominio, el cual es reconocido por furina para su activación durante su secreción. Por lo que todas las MT-MMPs están activas en la superficie celular (62,65).

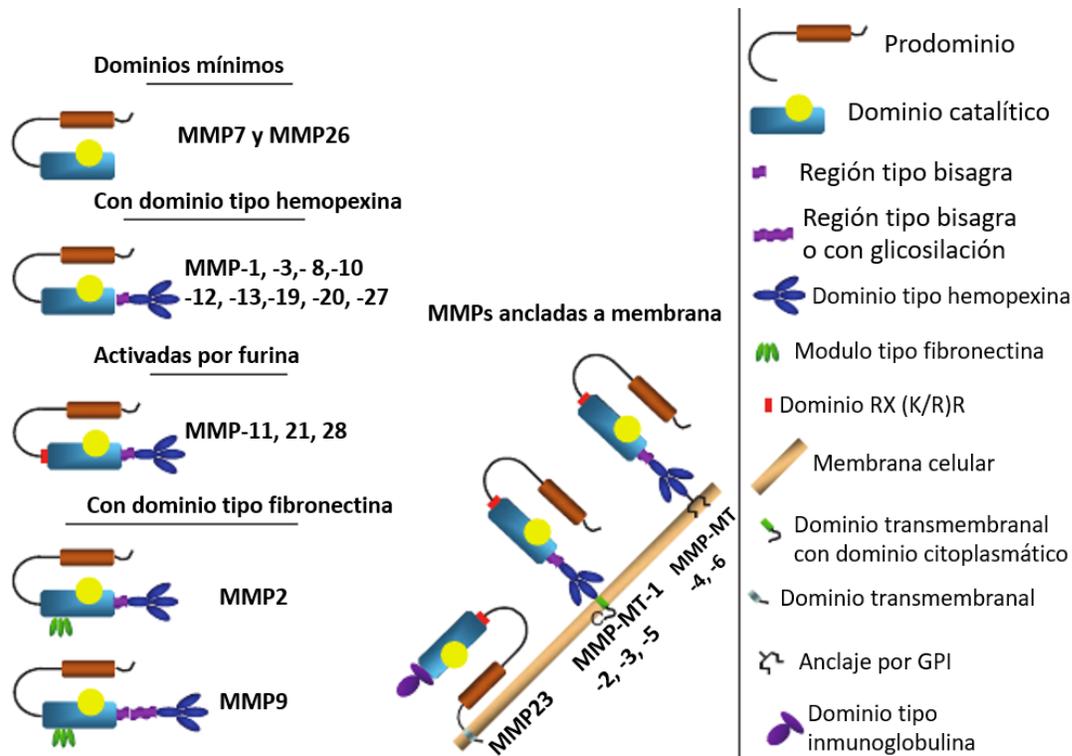


Figura 3. Estructura de las metaloproteinasas de la matriz. Agrupación de las metaloproteinasas por sus dominios. Las MMPs tipo membrana pueden tener dominio transmembranal o estar ancladas por GPI. Tomada y traducida de Hadler-Olsen E. *et al. FEBS J.* (2011.)

Todas las MMPs son sintetizadas como zimógenos o proenzimas gracias al prodominio que contienen, después son secretadas o ancladas a la membrana y subsecuentemente son activadas, lo cual es fundamental para mantener la homeostasis del tejido. Sin embargo, estudios recientes demuestran que algunas MMPs pueden encontrarse dentro de la célula actuando como proteínas intracelulares, tales como la MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 y MMP13 y MMP28 (62,66,67,68,69.) Todas las MMPs tienen un péptido señal N-terminal o un prodominio, el cual está constituido de alrededor de 80 aminoácidos, y esta conservado

en todas las MMPs excepto la 23. El pro dominio se encarga de mantener a la enzima en estado de zimógeno por medio de un motivo PRCGXPD, el cual se une por un residuo de cisteína altamente conservado a la secuencia consenso HEXGHXXGXXH del dominio catalítico manteniendo su estado de latencia (66,67).

Regulación de las MMPs

La mayoría de las MMPs son reguladas a nivel de transcripción, excepto MMP9 y MMP8 en neutrófilos, aunque los factores que regulan la expresión de las MMPs en los diferentes tejidos actualmente no son claros. Sin embargo, diferentes factores externos impactan a nivel transcripcional, dentro de estos factores podemos incluir citosinas inflamatorias, hormonas y factores de crecimiento, como el TGF β), el receptor de factor de crecimiento epitelial (EGFR), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleucina-1 β (IL-1 β). Además, varios estudios demuestran que prostaglandina E2 (PGE2), una molécula lipídica bioactiva, sobre expresa los genes de MMP-1, MMP-2, MMP-9, y MT1-MMP (70,71). Aunque la regulación de las MMPs a nivel transcripcional también se puede dar por polimorfismos en los promotores de estas, por ejemplo, el polimorfismo rs1799750 en el gene de la MMP1 que provoca una sobre expresión de esta enzima (72). Ahora bien, la regulación transcripcional también puede ser regulada por diferentes eventos epigenéticos como la modificación de histonas y metilación de DNA, por ejemplo, se tiene bien documentado que la inhibición histona deacetilasa induce la expresión de la MMP1 y MMP13 (73).

Las MMPs tienen cuatro inhibidores específicos en vertebrados llamados Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas (TIMPs del inglés Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) 1, 2, 3 y 4, de los cuales los TIMP's 1, 2 y 4 son proteínas de secreción, mientras que el TIMP- 3 se encuentra anclado a la MEC. Su función consiste en inactivar a las MMP's formando complejos enzimáticos 1:1 desplazando las moléculas de agua del dominio catalítico dejándola inactiva (74).

No solo los TIMPs se encargan de la regulación de las MMPs, se ha comprobado que también algunos inhibidores de proteasas generales, como la α 2-

macroglobulina, cuya principal función consiste en bloquear a las MMPs del plasma y fluidos tisulares. Así mismo, se ha observado que algunas proteínas recientemente descritas también inhiben a las MMPs, como TFPI-2 (Inhibidor de la vía del factor tisular 2) RECK una glicoproteína anclada a GPI, pues presentan grandes similitudes con el N-terminal de los TIMP's. (71,64).

Activación de MMPs

Como se señaló anteriormente, las MMPs son secretadas en forma de zimógeno, lo cual quiere decir que son inactivas, debido a que el prodominio se encuentra unido a el sitio catalítico por medio de un grupo tiol no pareado en el carboxilo terminal de una cisteína. Esta cisteína actúa como un inactivador de los 4 ligandos para el átomo catalítico de Zn, resultando en la exclusión del agua y por lo tanto la inactividad de la enzima (61) (Figura 4).

Para que las MMPs puedan ser activadas, el enlace entre la cisteína y el Zn tiene que romperse por un cambio conformacional o proteólisis, aunque también puede ser por medio de otras proteinasas (Figura 4). *in vitro* la activación de las MMPs se puede dar algunos agentes químicos como tioles modificados, SDS, especies reactivas de oxígeno, pH bajo y tratamientos de calor (63,65).

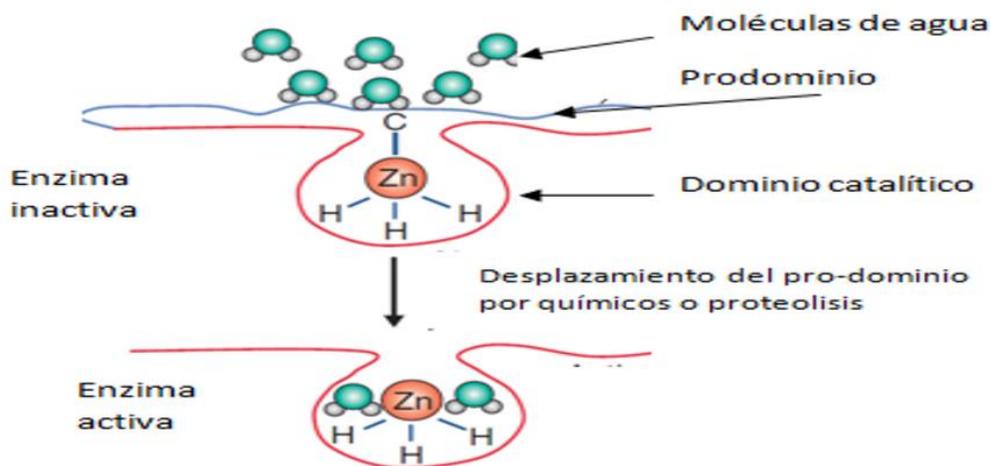


Figura 4. Activación de las MMPs. Tomada y traducida de Somerville RP. *et al*, *Genome Biol.* (2003).

Como ya se había mencionado antes las MMPs son una familia de enzimas envueltas en diferentes procesos tales como inflamación, remodelación de tejidos y procesamiento de distintos componentes de la MEC, además de tener otros sustratos distintos a los clásicos de la MEC, los cuales pueden tener diferentes efectos en varios mecanismos de regulación. En condiciones de homeostasis las MMPs son expresadas a distintos niveles en distintos tejidos, una característica que en muchas ocasiones puede ser difícil reproducir *in vitro*. Sin embargo, en condiciones patológicas podemos tener un estimado comparativo con un entre un tejido enfermo y uno sano o control. Tal es el caso de algunas MMPs que se sobre expresan en fibrosis pulmonar y FPI, jugando un papel patofisiológico clave, ya sea siendo un mediador pro fibrosante o anti fibrosante como una gran cantidad de experimentos *in vitro* e *in vivo* lo demuestran (74,75).

MMPs y Fibrosis Pulmonar

Durante mucho tiempo se hipotetizo que la fibrosis en general era una deficiencia o anomalía en expresión, síntesis o actividad de las MMPs, sin embargo, se ha demostrado tanto en modelos *in vivo* en ratones KO como *in vitro* que algunas de ellas pueden jugar roles pro fibróticos y anti fibróticos como se muestra en la tabla 1.

En la FPI una de las MMPs sobre expresadas es la MMP19, ~~tanto la cual se encuentra sobre expresada~~ a nivel de genes y como proteína en células epiteliales alveolares hiperplásicas en pacientes con FPI. Ensayos *in vivo* en células A549 (línea celular de células alveolares tipo II provenientes de un adenocarcinoma) demostraron que las células silenciadas para MMP19 tienen una menor capacidad de cierre de herida, así como una menor capacidad para migrar a través de una matriz, procesos presentes en la reparación epitelial, resultado totalmente contrario al de las células que las sobre expresaban. Por lo que, se podría considerar que MMP19 juega un papel crítico en la regulación epitelial después de una herida (1,69,70). En experimentos realizados en paralelo, pero en un ratón KO de la

Mmp19 al que se le indujo fibrosis por medio de bleomicina se observó que los ratones que no tenían la Mmp19 desarrollaban un mayor grado de fibrosis, así como una mayor acumulación de colágenas en comparación con el ratón WT. Así mismo en fibroblastos pulmonares extraídos de estos ratones presentaron una mayor capacidad de migración, proliferación, diferenciación a miofibroblastos y síntesis de colágena eventos de suma importancia durante la fibrogénesis, demostrando tener un fenotipo más fibrótico en todas las condiciones que los WT (70). Estos datos sugieren que la MMP19 tiene un papel anti fibrótico.

El análisis por microarreglos de tejido pulmonar de pacientes con FPI y sanos, reveló que algunas MMPs como la MMP1 y MMP7, están sobreexpresadas. Para determinar el papel de MMP7 en el proceso fibrótico se analizó en ratones deficientes de MMP7 e instilados con bleomicina el desarrollo de fibrosis pulmonar. El resultado mostró que los ratones deficientes en MMP7 están protegidos de la fibrosis (72,73,74,75), concluyendo que la MMP7 es un regulador pro fibrosante.

Como ya se había mencionado, los análisis de expresión de genes facilitan detectar las enzimas y los mecanismos moleculares que participan en la FPI. Una de las enzimas sobre expresadas en la FPI es la MMP1 o colagenasa I, la cual es capaz de degradar colágenas fibrilares; además es expresada de manera intracelular en células epiteliales alveolares de pacientes con FPI, algo que llamo la atención de los investigadores, pues es una MMP de secreción, por lo que hipotetizaron que la MMP1 podría ser un regulador de la interacción entre epitelio y mesénquima o influenciar en la conducta del epitelio alveolar durante la evolución de la fibrosis. Como el ratón carece de la MMP1 no es posible analizar el papel de esta enzima en ratones instilados con bleomicina, por lo que expresaron MMP1 humana en células epiteliales alveolares de ratón de la línea MLE12 con experimentos de ganancia de función. Las células MLE con la MMP humana mostraron una mayor capacidad de proliferación, migración, cierre de herida y resistencia a apoptosis en comparación con las células control . Interesantemente, las MLE12 que expresaban MMP1 presentaron un menor consumo de oxígeno debido a que MMP1 afectaba la función mitocondrial y por lo tanto había menos especies reactivas de oxígeno y una

sobre expresión de HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) lo que provocaba los efectos en la proliferación, migración y apoptosis (75,76).

El último miembro descubierto de la familia de MMPs es la MMP28, una enzima presente en distintos epitelios, además de que el RNAm de esta enzima parece contribuir a la homeostasis epitelial. En pacientes con FPI la MMP28 se encuentra sobre expresada en células epiteliales alveolares, lo cual se corroboró por medio de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, reportando por primera vez que la MMP28 tenía una localización nuclear, cabe recalcar que otras MMPs como MMP2, MMP3 y MMP12 han sido reportadas en el núcleo, donde se ha propuesto que estas enzimas tienen un rol en la transcripción de genes o en la apoptosis. Se demostró que la MMP28 incrementa la proliferación, migración además de dar resistencia a la apoptosis. Por otro lado, al montar el modelo de fibrosis inducido por bleomicina en un ratón Mmp28KO, este resultó ser resistente a la fibrosis. (62,67)

Yamashita y colaboradores realizaron un análisis de expresión de MMPs en pulmones de pacientes de FPI, enfocándose en la MMP3 y para determinar el papel de la enzima se instiló con bleomicina ratones deficientes de Mmp3. El resultado mostró que estos ratones presentaban menos fibrosis que los WT.

La MMP8 o también llamada colagenasa 2, una enzima relacionada con procesos inflamatorios debido a su capacidad de procesar fibras de colágena tipo I, así como otros sustratos de la MEC; el ratón Mmp8KO presenta una cicatrización tardía debido a una persistencia inflamatoria, además de una disminución en el depósito de colágena en estas heridas. El ratón deficiente de Mmp8 instilado con bleomicina desarrolla un menor grado de fibrosis en comparación al WT y propusieron que el mecanismo incluye la regulación de los niveles de IL-10 sustrato de esta enzima. (76).

MMP13 o colagenasa 3 es una enzima expresada en múltiples tipos de cáncer y lamentablemente conforme es mayor su expresión, es mayor la probabilidad de un mal pronóstico. En FPI la MMP13 es altamente expresada a nivel RNA y proteína por el epitelio alveolar y bronquial, donde al parecer juega un papel fundamental en

la TEM. Cabe resaltar que esta metaloproteinasa es de suma importancia en roedores, pues estos carecen de Mmp1; en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina el Mmp13KO presentó un mayor grado de inflamación y fibrosis, misma que tardaba más tiempo en ser resuelta, sugiriendo un papel anti fibrótico (77).

Tabla 1. comparación entre los distintos ratones Mmp KOs y el papel de cada enzima en la FPI, así como en el modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

| Mmp / Papel en la fibrosis pulmonar | Características en la FPI y el modelo murino de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina |
|---|--|
| Mmp 7 Profibrótica | <p>Sobre expresada en microarreglos e inmunohistoquímica de tejido de pacientes con FPI, específicamente en células epiteliales, fagocitos mononucleares y fibrocitos (73).</p> <p>Se generó el KO en dos cepas distintas de ratón (129SVJ y C57BL6) y al someterlas al modelo de bleomicina, ambas presentaron una fibrosis casi nula, en comparación con sus contrapartes WT (74).</p> |
| Mmp 28 Profibrótica | <p>En FPI es principalmente expresada en células epiteliales con una localización tanto citoplasmática como nuclear, además de estar más concentrada en suero sanguíneo de pacientes con FPI (107).</p> <p>En el modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina es expresada en células epiteliales y macrófagos intraalveolares. Por otro lado, su KO presenta un menor acumulación de colágena, además de que las células epiteliales de estos presentaban una menor capacidad de migración en comparación con el WT (108, 109).</p> |
| Mmp 3 Profibrótica | <p>Altamente expresada a nivel de RNAm y proteína en pacientes con FPI en células epiteliales bronquiales y alveolares, macrófagos alveolares y fibroblastos (78, 110).</p> <p>Al infectar ratas con un adenovirus de expresión de esta metaloproteinasa estas, presentaron una fibrosis espontánea, así como una acumulación de focos de fibroblastos. En cuanto al ratón KO, este presentó un menor desarrollo de fibrosis en el modelo de bleomicina en comparación con el WT, relacionándose con la vía de B-catenina y la TEM (110,111).</p> |
| Mmp 8 Profibrótica | <p>Es expresada en células epiteliales bronquiales de zonas con una fibrosis severa en pacientes con FPI, además de encontrarse incrementada en LBA de estos (112).</p> <p>El ratón KO desarrollo un menor grado de fibrosis experimental por bleomicina que su contra parte WT, relacionado con la síntesis de colágena de sus fibroblastos al no procesar IL-10 (113).</p> |
| | <p>Por medio de un análisis de microarreglos en células alveolares de pacientes con FPI se localizó expresada en células epiteliales hiperplásticas, adyacentes a las regiones</p> |

| | |
|---------------------------------|---|
| <p>Mmp 19 Antifibrótica</p> | <p>fibróticas, lo cual fue corroborado por WB e inmunohistoquímica (79, 69).</p> <p>En el modelo de fibrosis inducida por bleomicina el KO, presento un mayor grado de fibrosis, pues sus fibroblastos sintetizaban más colágena, además de presentar una mayor capacidad de migración y diferenciarse a miofibroblastos que su contra parte WT (70).</p> |
| <p>Mmp 1 Antifibrótica</p> | <p>En FPI es expresada en células epiteliales recubriendo zonas de fibrosis intraalveolar, incrementando su proliferación, migración promoviendo el cierre de heridas e inhibiendo la apoptosis de estas (74).</p> <p>MMP 1 no tiene un homologo como tal expresado en el ratón, por lo que no hay un KO, aunque se han hecho estudios transfectando plásmidos que contiene MMP1 humana en hígados fibróticos de rata resolviendo la fibrosis más rápido que sus respectivos controles (80, 114).</p> |
| <p>Mmp 13 Antifibrótica</p> | <p>Altamente elevada a nivel de RNAm y proteína de tejidos de FPI, presentando una localización específica en el epitelio alveolar y bronquial, septos alveolares y espacios intersticiales (78,115).</p> <p>En el modelo de bleomicina el ratón KO presento un mayor grado, asociado a una temprana inflamación (116).</p> |
| <p>Mmp 14 Antifibrótica</p> | <p>En condiciones normales no es expresada en el pulmón, sin embargo, de todas las MMPs de membrana, esta es la más expresada en tejido pulmonar de pacientes con FPI, específicamente en células del epitelio alveolar tipo II (94).</p> <p>Cabe resaltar que de todos los ratones KO de las Mmps, el de la Mmp14 es el único letal, por lo cual no se tiene un modelo de fibrosis que se enfoque en el estudio de esta enzima(99).</p> |

MMP14

La MMP14 o MT1-MMP fue originalmente descubierta y caracterizada en 1994 como un activador de la proMMP2 en células invasivas de cáncer. Sin embargo, no solo las células cancerosas expresan MMP14, ya que en condiciones de homeostasis también se expresa en otros tipos celulares como células mesenquimales, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, condrocitos, células epiteliales, endoteliales, adipocitos, células mieloides, neuronas y células B y T (81).

La MMP14 presenta una gran variedad de sustratos, tales como proMMP-2, proMMP-13 (aunque el mecanismo de activación no es muy claro en esta), ADAM9, gelatina, Colágena tipo I,II y III, fibronectina, vitronectina, lamininas-1-2/4-5, fibrina/fibrinogeno, inhibidor de proteinasas- α (α 1PI), perlecano, receptor CD44, molécula intracelular de adhesión 1 (ICAM-1), transglutaminasa tisular (tTG), receptor asociado a lipoproteína 1 (LRP1), sindecano 1, integrin α v, inductor de metaloproteinasas, β -glicano, ineterleucina 8 (IL-8), antileucoproteinasas 1 (SLP1), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), galectina-1, (proteína de choque térmico 90 (Hsp90 α), pentraxina 3, progranulina, inductor angiogénico rico en cisteína (Cyr61), peptidil- proteína dickkopf-1, kisspeptina 1 (KiSS-1) (82, 83). La regulación de MMP14 a nivel proteína se da por los TIMPs-2,-3-4, pero no por el TIMP-1, además de estos inhibidores específicos se tiene reportado que MMP14 puede ser inhibida por otras moléculas como RECK (proteína inductora de reversión rica en motivos Kazal), condroitina/heparan sulfato, testican 1 y 3, así como una variante por splicing de testican-3, aunque el mecanismo no es conocido (83,84).

Transcripcionalmente MMP14 es regulada por el factor de transcripción PROX1, el cual es esencial para el desarrollo, además en cáncer PROX1 juega tanto el rol oncogénico, como el supresor de tumores. En el caso de MMP14 PROX1 se une al promotor de MMP14 inhibiendo su transcripción. En el PROX1KO los niveles de MMP14 son más altos que el en WT, así como en una línea celular de hepatocarcinoma cuando se sobre expresaba PROX1 la expresión de MMP14 disminuía y cuando se silenciaba MMP14 aumentaba su expresión (85).

Como se mencionó anteriormente la MMP14 tiene como sustrato a la proMMP2. La activación de la MMP2 comienza al formarse un homodimero de MMP14 a través de su dominio tipo hemopexina y su dominio transmembranal (Figura 5B). seguido de la formación del homodimero, una de las moléculas de MMP14 es inhibida por TIMP-2 al unirse en su dominio catalítico en la región amino terminal (Figura 5C), pro-MMP2 presenta afinidad por el amino terminal de TIMP2, por lo que se forma un complejo (MMP14)₂, TIMP2, proMMP2 (Figura 5D), una vez formado el complejo la otra MMP14 que no está unida al TIMP y que su dominio catalítico esta libre corta

el predominio de MMP2, liberándola activa (Figura 5E) (87).

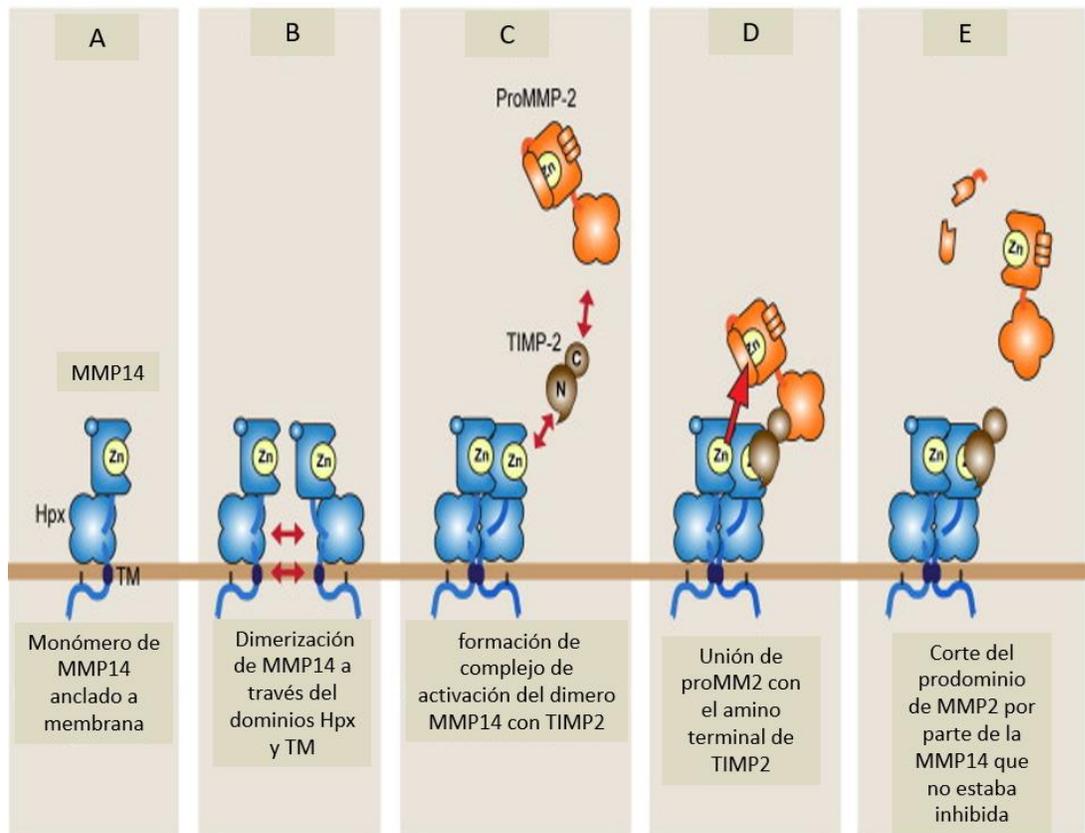


Figura 5. Pasos para la activación de proMMP2 por el complejo de MMP14 y TIMP2. Tomado y traducido de Itoh Y. *Matrix Biol.* (2015)

Una de las importantes funciones que tiene la MMP14 es la degradación de colágena fibrilar. Debemos tomar en cuenta que la colágena es el mayor componente de MEC, la cual tiene un rol importante al mantener la arquitectura de los tejidos y órganos, además de dar soporte a las células. La MMP14 es la única MT-MMP capaz de degradar colágenas fibrilares pericelularmente, lo cual es de suma importancia para la remodelación de los tejidos como se evidencia en el *Mmp14KO*, e igual que todas las colagenasas escinden a la colágena en un sitio específico, a $\frac{3}{4}$ de distancia del amino terminal y de ahí inicia la desnaturalización de la triple hélice de colágena en gelatina, la cual es susceptible de degradación de varias proteinasas (86,88). MMP14 es una colagenasa muy importante durante la migración celular, pues se ha demostrado en matrices de colágena tipo I que

MMP14 promueve la migración celular de células epiteliales y fibroblastos, algo que las otras colagenasas solubles no pueden hacer (96,97).

Ratón Mmp14KO

Los organismos transgénicos han ayudado a entender el rol o función que cumplen algunas proteínas en el desarrollo embrionario, crecimiento, reproducción etc. por lo que son de suma importancia para el desarrollo de la biología celular, molecular, genética etc; así como para distintas patologías. Se han generado distintos ratones Knockout (KO) o carentes de casi todas las MMPs, por ejemplo, MMP2KO, MMP3KO, MMP7KO, MMP8KO MMP9KO, MMP12KO, MMP19KO, MMP28KO; en los cuales se ha montado el modelo de bleomicina. Cabe resaltar que ninguno de estos ratones KO presentan problemas en el desarrollo embrionario, reproducción o crecimiento. Para conocer el rol fisiológico de Mmp14 Holmbeck y colaboradores diseñaron un ratón Mmp14KO, el cual es el único ratón letal de toda la familia de Mmps. Este ratón Mmp14KO neonato no presentaba diferencias con el WT o el heterocigoto, sin embargo, al hacer un análisis de rayos X se observó que presentaba una formación aberrante del cráneo, a los 3-5 días presentaba un peso menor hiperlordosis, dwarfinismo, osteopenia, artritis y displasia, además de no presentar maduración sexual, por último, el ratón moría a las pocas semanas de edad. Las células extraídas del Mmp14KO son incapaces de degradar la colágena tipo I y III pericelular, lo cual es necesario para para el crecimiento y desarrollo, conjuntamente también se presentan poca degradación de algunos componentes de membrana basal como colágena tipo IV, ya que al no estar presente la MMP14 la activación de proMMP2 es nula o escasa (89, 90, 91,92). La angiogénesis por sí misma, es un proceso de invasión celular por parte de las células endoteliales. Donde las células endoteliales necesitan separarse de las células vecinas e invadir un nuevo tejido, proliferar y generar la estructura de tubo. Durante este proceso, es necesaria la degradación la degradación de lámina basal, fibrina y colágena. Estudios previos mostraron la participación de MMP2, MMP9 y MMP14, sin embargo, Chun y colaboradores demostraron que la única MMP esencial para este proceso era la MMP14, pues el ratón Mmp14KO presentaba defectos en la

formación de vasos, aun estando presentes la MMP2 y MMP9 (93).

MMP14 es esencial para la alveolarización.

Al realizar un análisis histológico de pulmones postnatales de ratones Mmp14KO y WT se observó que los KO tenían unos alveolos más amplios pues presentaban un 40% más de superficie alveolar y un 46% más de diámetro del alveolo en comparación con los WT, lo cual es consecuencia de una inadecuada formación alveolar. Por lo que los autores supusieron que la Mmp14 juega un papel importante en la alveolarización, lo cual se confirmó por medio de hibridación *in situ* de RNA y por inmunohistoquímica, observando una gran expresión de Mmp14 en el parénquima pulmonar, en las paredes alveolares, así como células endoteliales en el WT. Al analizar por qué la deficiencia de MMP14 causa este efecto en la alveolarización encontraron que se debía a la falta de colágenolisis de los fibroblastos y condrocitos, pues se necesita la remodelación de la colágena para el desarrollo del pulmón y la ausencia de Mmp14 representa una colágenolisis fallida. Concluyendo que el requerimiento de la actividad de Mmp14 especialmente la degradación de colágena es necesaria en el desarrollo alveolar y es una de las causas de muerte de los ratones Mmp14KO a los pocos días de nacidos (90,91,92).

MMP14 y EMT

MMP14 es una MT-MMP ampliamente estudiada en distintos tipos de tumores y altamente correlacionada con la EMT, debido a que su expresión aumenta su capacidad invasión y migración celular. Un estudio relaciona a MMP14 con la molécula Nogo-b, un miembro de las proteínas presentes en el retículo endoplásmico, localizada en el mismo y la membrana celular, la cual esta relacionada con la EMT en diferentes órganos como riñón e hígado. En el modelo de bleomicina Nogo-b es expresado por células alveolares tipo II, mismas que sobre expresaban a MMP14. Así que silenciaron a Nogo-b y a su vez a MMP14 en células A549 donde tuvieron una TEM escasa, y poca activación del TGF- β 1 latente, por lo que se concluye que Nogo-b incrementa la actividad proteolítica de MMP14 para

activar el TGF β 1 latente lo que promueve la actividad pro fibrótica del TGF- β (92).

MMP14 y migración de fibroblastos

La expresión de MMP14 en pulmón adulto sano es nula, por lo que cabe resaltar que en distintas enfermedades pulmonares se encuentra sobre expresada y lamentablemente no se sabe el mecanismo de acción de esta MMP en estas, tal es el caso de asma, enfisema y la FPI, enfermedad caracteriza por un acumulamiento excesivo de fibras de colágenas fibrilares. De los 23 miembros de la familia MMPs en ratón, solo un subconjunto de estas participa en la degradación de colágena tipo I: mColA, MMP-8 y MMP-13, (aunque algunos autores afirman que también la MMP2) y de las MMP ancladas a la membrana, MT1-MMP (MMP-14) y MT2-MMP (MMP-15). Sin embargo, los fibroblastos de pulmón de ratón en condiciones basales solo se expresan MMP2, MMP13 y MMP14. Al cultivar fibroblastos de pulmón KO de cada una de estas enzimas en una matriz de colágena tipo I, solo los fibroblastos MMP14KO son incapaces de degradar la colágena pericelular. Por otro lado, también se midió la capacidad de migración en una matriz de colágena tipo I en fibroblastos WT comparados con MMP14KO, observándose, una nula migración por parte de los fibroblastos MMP14KO. Resultados similares se observaron en fibroblastos humanos, a los que se les silencio MMP14 por medio de un siRNA. La pérdida de la expresión de MMP14 provocaba que estos fibroblastos perdieran la capacidad de degradar colágena tipo I pericelular, así como migrar a través de una matriz de este mismo sustrato. Por lo que podemos suponer que MMP14 juega un rol central en la degradación de colágena tipo I y migración de fibroblastos pulmonares humanos como de ratón (93,94).

Justificación

Estudios en nuestro grupo de trabajo han demostrado que algunas MMPs están sobre expresadas en FPI y desempeñan un papel importante en la patofisiología de esta, ya sea teniendo un efecto pro fibrosante (MMP7, MMP28, MMP3 y MMP8) o anti fibrosante (MMP9 y MMP19).

Dentro de nuestro grupo de trabajo una de las MMPs reportadas como expresadas en el epitelio alveolar de pacientes de FPI es la MMP14 (94) así como también se encuentra sobre expresada en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, y en células epiteliales alveolares en el modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (95). La MMP14 o MT1-MMP una metaloproteasa asociada a membrana que se ha relacionado con la degradación pericelular de colágena fibrilar, activación de la MMP-2, la migración celular y que se le ha involucrado con la transición epitelio mesénquima; eventos presentes en la FPI y los modelos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (82,88,94).

El uso de organismos transgénicos es de suma importancia para conocer el papel que desempeñan las MMPs en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, sin embargo de entre todos los KO de las Mmps solo el Mmp14 es el único letal; entre los defectos que llevan a la muerte a este ratón podemos mencionar la baja o casi nula degradación de colágenas fibrilares, especialmente la tipo I y III, formación aberrante del cráneo, hiperlordosis, dwarfismo, osteopenia, artritis y displasia, además de no presentar maduración sexual; sin dejar de lado que este ratón no presenta un correcto desarrollo alveolar (89,91).

Tomando en cuenta todas las consideraciones antes mencionadas, es de suma importancia desarrollar un estudio para elucidar el papel que tiene la MMP14 en las células alveolares tipo II en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, por lo que es necesario generar de un ratón KO condicional de la Mmp14 específicamente en las células alveolares tipo II, el cual lleve a cabo todo su desarrollo y crecimiento de forma normal expresando a la Mmp14, pero a las seis semanas de edad

aproximadamente pierda la expresión de esta enzima por medio de un estímulo de doxiciclina, para poder montar el modelo y de esta manera tratar de entender el papel de Mmp14 en los neumocitos tipo II en la fibrosis pulmonar.

En este contexto los objetivos de esta tesis fueron:

1. Generar un ratón condicional a doxiciclina de MMP14 (Sftpc-Mmp14-cKO) en las células alveolares tipo II.
2. Examinar el papel de la Mmp14 en la etapas de inflamación (7días), fibrótica (21 días) y resolución (120 días) en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones Sftpc-Mmp14-cKO sin el estímulo de doxiciclina y en ratones Sftpc-Mmp14-cKO con el estímulo de doxiciclina.
3. Analizar el efecto *in vitro* que tiene la ausencia o la sobre expresión MMP14 en células alveolares tipo II humanas en distintos procesos clave en el desarrollo de fibrosis.
4. Evaluar el efecto de las células alveolares tipo II silenciadas de MMP14 sobre fibroblastos

Hipótesis

Mmp14 tiene un efecto anti fibrosante en las células alveolares tipo II en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, ya que al estar ausente esta enzima se favorece un fenotipo fibrótico, sintetizando distintas moléculas que promueven la activación y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, lo que finalizara con un acumulamiento excesivo de fibras de colágena.

MATERIAL Y METODOS

Determinación genotípica de ratones por PCR

Todos los protocolos animales fueron aprobados por el comité de ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER, Ciudad de México, México). Los ratones utilizados para generar el triple transgénico fueron el

ratón MMP14^{F/FI} y el ratón Sftpc^(rtTa/TetO-Cre) que amablemente fueron donados por el Dr. Carlos López Otín de la Universidad de la Universidad de Oviedo, España y la Dra. Ana L. Mora de la Universidad de Pittsburgh, Estados Unidos respectivamente.

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

Administración de doxiciclina.

Para la delección del gen de Mmp14 en el ratón condicional se utilizó el sistema Tet-on inducido por doxiciclina (sigma aldrich), la cual se les administro a los ratones por medio de agua 100mg/0.5L con sacarosa al 50%, debido a que el agua sola con la doxiciclina queda muy acida y los ratones no la toman. Se les administraba el bebedero cada dos semanas y se les retiraba hasta que se lo terminaban (aproximadamente en una semana).

Modelo experimental de fibrosis pulmonar.

Ratones de 8 semanas de edad Sftpc-Mmp14-cKO con el estímulo de doxiciclina y sin el estímulo de doxiciclina se anestesiaron con una dosis de Avertin® (Tribromoetanol 2.5gm 2, 2,2;5 mL2-methyl2butanol disuelto en 200microlitros de agua destilada) vía intraperitoneal. Una vez anestesiado el ratón se le realizo un corte en la piel del cuello para exponer la tráquea y se instilo una dosis de bleomicina

de acuerdo al peso del ratón en la proporción de 5u/kg o la solución salina a través de una jeringa estéril de insulina de 1ml. Se uso una grapa quirúrgica estéril para cerrar el corte en la piel del cuello y se roció la zona con Topazone (poner r de marca) para evitar infecciones y favorecer la cicatrización. Los ratones se sacrificaron a los 7,21 y 120 días post-instilación para analizar la etapa inflamatoria, fibrótica y la resolución de la fibrosis del modelo.

Eutanización.

Los ratones Sftpc-Mmp14-cKO con el estímulo de doxiciclina y sin el estímulo de doxiciclina fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico calculada a partir del peso del ratón. Los pulmones fueron quirúrgicamente removidos de la cavidad torácica y lavados dos veces con solución salina precalentada a 37°C en agua a través de la arteria pulmonar. Los lóbulos derechos del pulmón fueron llenados cuidadosamente con una presión constante de formaldehído al 10% para su posterior análisis histológico. Los lóbulos izquierdos fueron conservados en nitrógeno líquido hasta su uso.

Determinación de hidroxiprolina

Los lóbulos pulmonares retirados del nitrógeno líquido se pesaron y se deshidrataron por calor a 110°C hasta que alcanzaron un peso constante. Posteriormente los pulmones fueron hidrolizados por 24hrs en HCl 6N a 110°C. los pulmones hidrolizados fueron entonces procesados de acuerdo a la técnica colorimétrica de Woessner (96). Brevemente se prepara la curva estándar con 1-10microgramos de hidroxiprolina y se emplean 50microlitros de cada muestra de pulmón de ratón. La reacción que nos permite determinar el contenido de hidroxiprolina presente en cada muestra inicia la oxidación del iminoácido por la adición de 1ml por muestra de cloramina T. después de 20 minutos la cloramina T es eliminada por la adición de 1ml de ácido perclórico 2.5N. Finalmente 1ml de p-dimetilaminobenzaldehído 20% se agrega y se incuba en baño a 60°C por 20 minutos. La absorbancia de la reacción es determinada en el espectrofotómetro a 560nm. Los contenidos de hidroxiprolina en pulmón se muestran en microgramos

de hidroxiprolina por pulmón izquierdo total.

Obtención de Lavado Bronquio-Alveolar (LBA)

Ratones Sftpc-Mmp14-cKO con el estímulo de doxiciclina y sin el estímulo de doxiciclina instilados con bleomicina 5U/kg o solución salina una vez eutanizados se expuso su tráquea insertándole una cánula y se hicieron lavados dos veces con 600µl de solución salina estéril precalentada a 37°C en baño maría. Para el conteo diferencial de las células inflamatorias las células del botón se resuspendieron en 200 microlitros de solución salina y carbowax 1:1. El número celular total fue obtenido mediante conteo manual con un hemocitometro estándar. Las células en el LBA se tiñeron con Wright-Giemsa y se cuantificaron por un patólogo experto (Dr. Miguel Gaxiola, INER, México).

Muestras de pulmones humanos

Todas las muestras se obtuvieron bajo protocolos de los Comités de Ética y todos los participantes dieron consentimiento escrito informado. Las muestras se obtuvieron del INER.

Western-Blot

En todos los casos la concentración de proteínas fue determinada por el reactivo de Bradford cargando en cada una de las muestras el contenido de 10 microgramos. Las muestras fueron separadas en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Las proteínas entonces se transfirieron a una membrana de PVDF (0.45micrometros, Millipore, Billerica,MA). Después de la transfección las membranas permanecieron bloqueadas con leche libre de grasa al 5% en 20nM Tris-HCl, 150mM NaCl, y Tween 20 0.05% por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas fueron incubadas por toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. Posteriormente las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 al 0.05% e incubadas con anticuerpo secundario e incubadas con el anticuerpo

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

Bacterias y plásmidos

Para amplificar los plásmidos se empleó la cepa DH5alfa de *Escherichia coli*, puesto que carece de sistema de recombinación; como medio de cultivo se utilizó LB líquido (BioRad) y LB agar (BioRad). El plásmido con la secuencia de MMP14 (pCMV6-AC-GFP+MMP14) se obtuvo de la empresa Origene (BC076638); así como, el vector control (pCMV6-AC GFP, PS100001, Origene). Estos vectores plasmídicos permiten ser multiplicados en *E.coli*, pero también son vectores en mamíferos. Tienen origen de replicación ColE1 para un alto número de copias en bacterias; así como el gen de la fosofotransferasa de neomicina que permite selección de procariontes con kanamicina o de eucariontes con un análogo de la neomicina como G418. Se prepararon bacterias competentes con CaCl₂, se transformaron con la técnica de choque térmico y los plásmidos se extrajeron mediante lisis alcalina.

Cultivo celular

La línea de células epiteliales alveolares de humano A549 se compró a la American Type Culture Collection (ATCC). Las células A549 se crecieron en medio Ham's F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10%, iniciando los protocolos de transfección en pasaje 4.

Transfección celular

Silenciamiento. Se siguió el protocolo para infección con partículas lentivirales control (shCtrl pGFP-V-RS) o con shMMP14 (origene TG311445). Una vez que se tenían las clonas estables se expandieron por dos semanas en medio con F-12 con puromicina (2µg/ml), la clona con más alto nivel de silenciamiento de RNAm de MMP14 fue seleccionada y llamada shMMP14, al mismo tiempo, células fueron transfectadas y seleccionadas con el shRNA control.

Transfección. Se realizó por lipoinfección con el compuesto lipoproteico turbofectin (Origene). Se sembraron 150,000 células A549 en cajas de 12 pozos. Al siguiente día se preparó el complejo turbofectina-DNA (1µg de plásmido pCMV6-AC-GFP+MMP14 o pCMV6-AC GFP (Mock)) con turbofectina (TF81001, origene). Se dejó en el medio de cultivo F-12 con 5% de suero 48 hrs. Enseguida, las células se lavaron tres veces con PBS estéril y se mantuvieron en medio selectivo durante dos semanas. El medio selectivo con G418 se usó 1.4mg/ml de acuerdo a las curvas que se prepararon con este tipo celular.

Análisis de tasa de crecimiento de células A549

Se emplearon sales de tetra sodio (WST-1) como indicador de las células metabólicamente activas en los cultivos primarios. Células epiteliales de la línea A549 humanas shCtrl, Mock, shMMP14 y +MMP14 en pasaje 4 fueron sembrados en placas de 96 pozos a una densidad de 4×10^3 células por pozo e incubadas a una temperatura de 37°C y 5% CO₂ en medio F-12 con SFB al 10% por toda la noche. A los tiempos indicados los medios de cultivo correspondientes fueron reemplazados por F-12 sin SFB y con 10 microlitros del reactivo de proliferación WST-1. Después de un periodo de tiempo de incubación de 2hrs a 37°C y 5% de CO₂ el medio fue recuperado para su lectura en una placa de ELISA. La absorbancia del medio fue cuantificada en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450nm usando una longitud de onda de referencia de 620nm. El aumento en la absorbancia para cada muestra fue tomado como veces sobre la lectura basal tomada de la misma forma el día 0 a la densidad celular inicial de 4×10^3 células/pozo.

PCR- Tiempo Real

Muestras de RNA total extraídas de los cultivos de las células transfectadas en condiciones basales fueron transcritas a cDNA mediante el kit High-Capacity cDNA Reverse transcription (Applied Biosystems, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los ensayos con sondas Taqman fueron para expresión de MMP14

Mm00485054_m1 (Applied biosystems) y 4352930E para el 18s rRNA eucarionte que se utilizó como control endogeno (Applied biosystems). La amplificación por PCR-Tiempo Real se realizó mediante el uso de termociclador i-Cycler iQ Detection System (Bio-Rad Laboratories). Los resultados de tres diferentes muestras fueron expresados como la media y la desviación estándar de una cuantificación relativa de el gen blanco normalizado con el rRNA18s. cada cDNA fue cuantificado por triplicado mediante una solución maestra, Mastermix (Applied Biosystems).

Inmunohistoquímica

El pulmón derecho fue fijado por instilación a presión constante con paraformaldehído al 10% en PBS 1x. A continuación, el tejido fue deshidratado en alcohol etílico a diferentes concentraciones (30, 50, 70 y 96%) y finalmente en xilol, por último, se embebió el tejido en parafina y se hicieron cortes de 5 micras. La extensión y grado de las lesiones, así como el porcentaje de inflamación y fibrosis, fueron evaluados después de la tinción tricrómica de Masson y Hematoxilina-Eosina. Los anticuerpos monoclonales empleados fueron incubados toda la noche a 4°C. posteriormente los tejidos se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con biotina y un complejo estreptavidina-peroxidasa (Biogenex), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para revelar, los tejidos se incubaron con 3-amino-9etil carbazol (AEC, Biogenex) como crómogeno, en un buffer de acetatos con 0.05% de H₂O₂ y finalmente los tejidos fueron contra teñidos con hematoxilina. En algunos tejidos el anticuerpo primario fue remplazado por suero no inmune como control negativo.

Actividad de β -galactosidasa.

Las células fueron sembradas en cubreobjetos, fijadas y teñidas con el kit β -galactosidase activity (Merk). Los núcleos se contra teñieron con hematoxilina. Las células positivas se determinaron por medio de un conteo de células β -galactosidasa positivas sobre el total de células por campo.

Análisis estadístico.

Todos los datos fueron expresados como promedios con su \pm desviación estándar. Se utilizaron la prueba t-student de dos colas y el ANOVA de dos vías. $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Todos los datos estadísticos fueron analizados utilizando GraphPad Prism version 7.00 (La Jolla California USA).

RESULTADOS

MMP14 es expresada en células epiteliales alveolares de pacientes con FPI.

Para corroborar los datos previamente reportados, se realizaron ensayos inmunohistoquímicos con los anticuerpos para MMP14 de la marca abcam (ab51074) y thermo Fisher (PA5-104459) en tejido pulmonar de pacientes con FPI y normales. Confirmando lo antes reportando por nuestro laboratorio que MMP14 es fuertemente expresada en células alveolares epiteliales en pacientes con FPI (94), específicamente en neumocitos tipo II hiperplásicos cuboidales, ocasionalmente también se localizó la proteína expresada en fibroblastos (Figura 6 A). Contrastando con el tejido pulmonar normal, donde la inmunohistoquímica para MMP14 no fue detectada (Figura B), así como en el tejido control negativo de un paciente fibrótico (Figura C). Estos resultados confirman que en la FPI existe una sobre expresión de MMP14 en el epitelio alveolar, específicamente en células alveolares tipo II de pacientes con FPI, lo que sugiere que esta MMP puede tener un papel fundamental específicamente en las células alveolares tipo II en el desarrollo de la FPI.

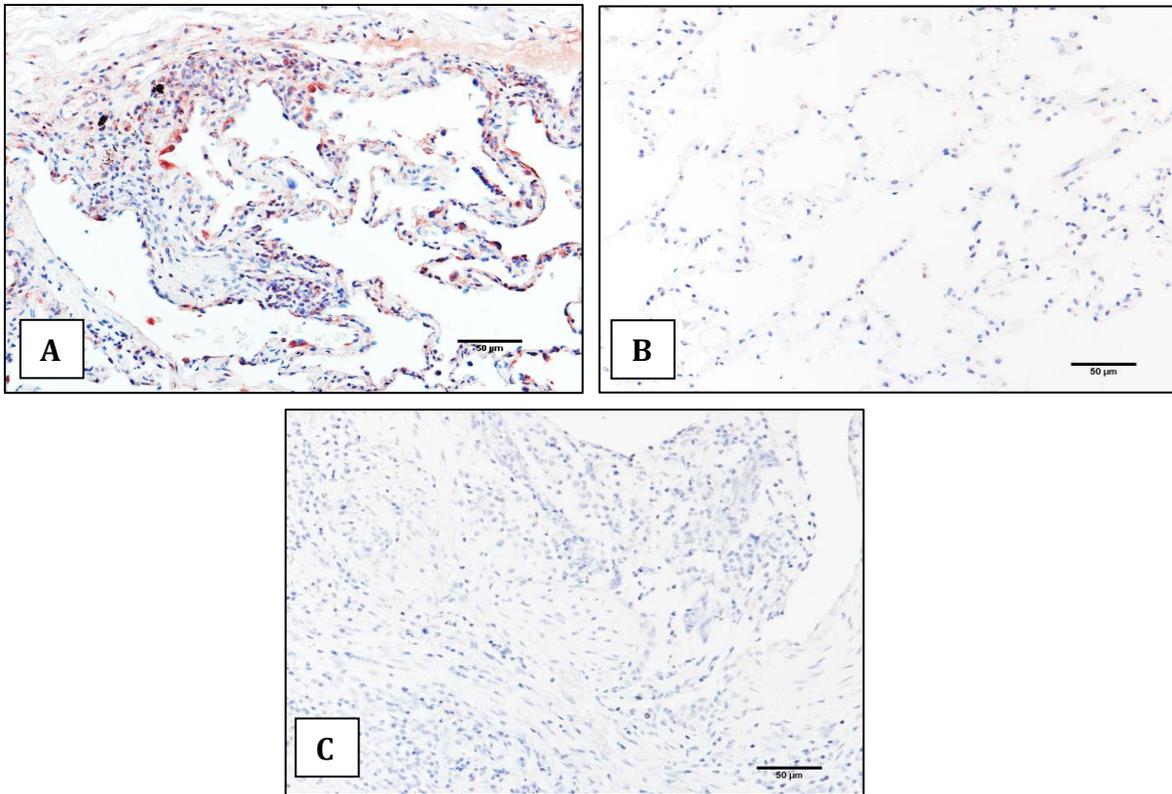


Figura 6. Expresión de MMP14 en tejido pulmonar normal y de pacientes con FPI. Inmunohistoquímica con anticuerpo específico de MMP14. (A) Tejido de paciente con FPI con anticuerpo de MMP14, donde se puede apreciar la expresión de esta encima en células epiteliales alveolares tipo II (CEAII). (B) Anticuerpo de MMP14 en tejido pulmonar de donante normal, donde la expresión de MMP14 es nula. (C) Tejido fibrótico solo con el anticuerpo secundario (control negativo) de paciente con FPI.

Generación de ratón condicional de Mmp14

Para esclarecer el papel de la Mmp14 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar se generó un ratón condicional, pues como se mencionó antes, el ratón KOMmp14 es el único ratón letal de toda la familia de Mmps (89,90). El ratón condicional de la Mmp14 se generó empleando el sistema Tet-On Cre-LoxP, una estrategia ampliamente utilizada en mutagénesis dirigida específica de tejido o tipo celular. El sistema Tet-On está basado en el transactivador reversible controlado por tetraciclina (rtTA del inglés reverse tetracycline-controlled transactivator), una proteína que al recibir el estímulo de doxiciclina es capaz de unirse a la secuencia

Tet-ON, la cual activa la expresión de la enzima Cre recombinasa, misma que reconoce y corta unas pequeñas secuencias específicas de nucleótidos llamados sitios loxP, estos sitios loxP normalmente se insertan uno a cada lado del gen que se desea eliminar los cuales al ser reconocidos y cortados por la Cre recombinasa se unen entre si formando un anillo el cual contiene el gen eliminado.

Para generar nuestro ratón utilizamos dos cepas distintas, la cepa MMP14^{Fl/Fl} la cual fue amablemente donada por el Dr. Carlos López Otín de la Universidad de Oviedo, España y la cepa Sftpc^(rtTa/TetO-Cre) que fue donada por la Dra. Ana L. Mora de la Universidad de Pittsburg, Estados Unidos.

Para la propagación de ambas cepas fue necesaria la creación y renovación constante de unidades reproductivas que nos permitieran mediante las cruzas adecuadas aumentar la población de los ratones para abastecer los experimentos necesarios. Con el objetivo de identificar ambas cepas de ratones transgénicos y silvestres (WT), se obtuvo DNA de un pequeño fragmento de la cola de cada uno de los organismos, cada fragmento de fue incluido en una reacción de PCR buscando amplificar tanto el transgén loxP y los transgenes rtTa/TetO-Cre. La reacción de PCR se hizo utilizando 100 ng de DNA de cada muestra con los oligonucleótidos específicos para los genes WT para cada transgén, los cuales son referidos en la sección de material y método.

Para generar el ratón condicional Sftpc-Mmp14-cKO se cruzaron homocigotos de entre 12 y 16 semanas de edad de los ratones MMP14^{Fl/Fl} (que contiene el gen de la Mmp14 flanqueada por los sitios loxP) y el ratón Sftpc^(rtTa/TetO-Cre) (Figura 7), colocando tres hembras y macho por unidad de apareamiento. Una vez generada la F1 de heterocigotos del ratón condicional, estos fueron cruzados durante 8 generaciones para generar el homocigoto condicional Sftpc-Mmp14-cKO (Figura 7). Este ratón no mostro ninguna diferencia en el desarrollo, reproducción o viabilidad en comparación con los ratones MMP14^{Fl/Fl}, Sftpc^(rtTa/TetO-Cre) y el WT.

El ratón que nosotros generamos tiene el gen de la Mmp14 flanqueado por sitios loxP, así como también presenta los transgenes rtTA, tet-ON y Cre insertados entre

el promotor y el gen de la proteína surfactante C, proteína que únicamente es sintetizada células epiteliales alveolares tipo II. Por lo tanto, cuando le administramos el estímulo de doxiciclina en el agua, esta se unir a la proteína rtTA, este transactivador va a ser capaz de unirse a la secuencia tet-ON, misma que activara la expresión Cre recombinasa, una vez que se traduzca esta enzima va a reconocer y cortar los sitios loxP que se encuentran flanqueando al gen de la Mmp14 y de esa manera eliminaremos la expresión de Mmp14 solo y exclusivamente en las células alveolares tipo II de estos ratones (Figura 7).

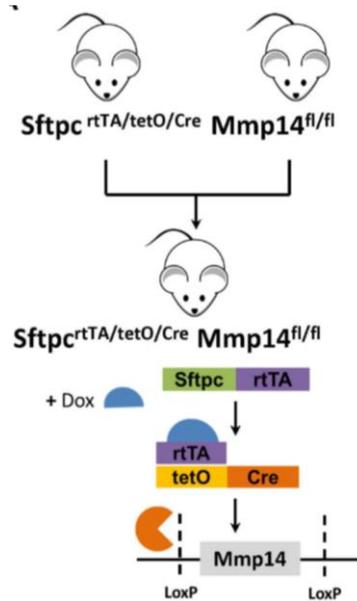


Figura 7. Delección específica de Mmp14 en CEAII. Diagrama que muestra la delección específica de Mmp14. El ratón inducible por doxiciclina Sftpc-Mmp14-cKO fue generado a partir de las cruces los ratones Sftpc/rtTA/TetO/Cre con Mmp14 fl/fl. También se muestra esquema de la delección de Mmp14 bajo el estímulo de doxiciclina.

Para corroborar la delección de Mmp14 en el ratón Sftpc-Mmp14-cKO se aislaron CEA II de ratones condicionales que recibieron el estímulo de doxiciclina dos semanas antes de la extracción celular, así como de ratones que no recibieron el estímulo. Los pulmones de los ratones Sftpc-Mmp14-cKO con y sin el estímulo de

doxyciclina fueron tratados con dispasa para obtener una suspensión de células epiteliales, las cuales fueron separadas por medio perlas magnéticas unidas al anticuerpo EpCAM (del inglés Epithelial Cell Adhesion Molecule). Una vez que teníamos las células epiteliales separadas de los demás tipos celulares se cuantifico la expresión de proteína surfactante C en la fracción positiva a EpCAM para comprobar que las células de esta fracción celular fueran CEAll, obteniendo como resultado que la gran mayoría de estas células expresaban el surfactante C (Figura 8A).

Una vez que teníamos aisladas las CEAll de los ratones Sftpc-Mmp14-cKO con y sin el tratamiento doxyciclina, nos dispusimos a evaluar si realmente habíamos logrado deletar Mmp14 en estas células, así que medimos la expresión de Mmp14 por medio de PCR cuantitativa, donde se presentó una notable reducción en la expresión de Mmp14 en las células alveolares de los ratones condicionales estimulados con doxyciclina comparándolas las CEAll del ratón condicionales sin el estímulo de doxyciclina (Figura 8B).

Para corroborar si la expresión de la proteína surfactante C se modificaba con el estímulo de doxyciclina o con la delección de Mmp14 en las células EpCAM positivas, se midió la expresión del surfactante C en ambos grupos de células con y sin doxyciclina del ratón condicional. Como se muestra en la figura 8C no se observaron diferencias entre ambos grupos, por lo que podemos decir que tanto la expresión de proteína surfactante C y el tipo celular de células alveolares tipo II es similar.

Con estos resultados demostramos que tenemos la delección de Mmp14, específicamente en las CEAll del ratón Sftpc-Mmp14-cKO después del tratamiento con doxyciclina por lo que podíamos montar el modelo de fibrosis pulmonar *in vivo*.

La ausencia de Mmp14 en células epiteliales alveolares tipo II aumenta la fibrosis y retrasa su resolución en el modelo de bleomicina.

Una vez que logramos la delección de la Mmp14 en las CEA II en nuestro ratón condicional se montó el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina para identificar el papel de esta Mmp durante el desarrollo y resolución de la fibrosis pulmonar. Para poder llevar a cabo nuestro estudio se trabajaron con tres grupos tanto de ratones condicionales como WT: el primer grupo solo recibió la dosis única de bleomicina, el segundo grupo solo recibió el estímulo de doxiciclina por medio del agua cada dos semanas, pero no recibió bleomicina; y el tercer grupo recibió ambos estímulos, la dosis única de bleomicina y el estímulo de doxiciclina respectivamente.

Modelo de fibrosis pulmonar por bleomicina

-Etapa inflamatoria del modelo de fibrosis inducida por bleomicina.

Todos los grupos de ratones tanto WT como Sftpc-Mmp14-cKO fueron evaluados histológicamente en tres distintas etapas, a los 7 días para evaluar la etapa inflamatoria, 21 días para la etapa fibrótica y a los 120 días que corresponde a la etapa de resolución de la fibrosis.

El modelo de bleomicina tiene una fase inicial inflamatoria previa al desarrollo de fibrosis, la cual puede ser observada a los 7 días post instilación con un aumento del infiltrado de células inflamatorias, mismas que pueden ser evaluadas por medio de un LBA por medio de un conteo manual con hemocitometro. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de macrófagos, neutrófilos y linfocitos. Cabe mencionar que en ningún grupo se observaron eosinófilos en los LBA (Figura 8).

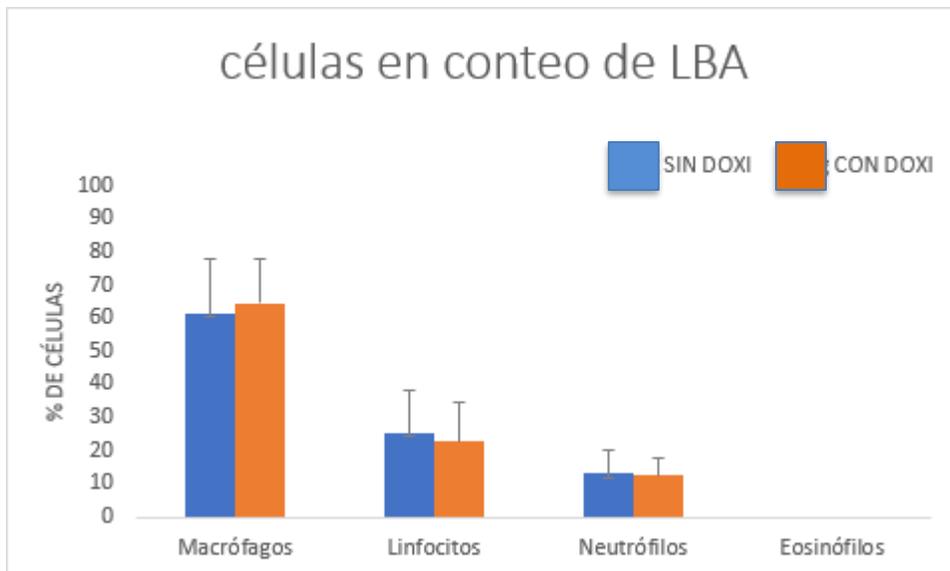


Figura 9. Conteo de infiltrado de células inflamatorias de lavados bronquio alveolares de ratones *Sftpc-Mmp14-cKO* con y sin el estímulo de doxiciclina. Los LBA se realizaron a los 7 días post bleomicina en ratones con y sin el estímulo de doxiciclina, sin encontrar ninguna diferencia en el infiltrado de células inflamatorias entre ambos grupos.

-Etapa fibrótica (21 días post instilación con bleomicina)

Para examinar el papel que podría tener la *Mmp14* en la etapa fibrótica en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, se evaluó la presencia de fibras de colágeno tipo I por medio de la tinción tricrómica de Masson, así como la extensión de la lesión en los tres grupos de ratones WT y *Sftpc-Mmp14-cKO* antes mencionados. Como se puede observar en las imágenes histológicas de la figura 10A los grupos de ratones tanto WT y *Sftpc-Mmp14-cKO* que solo recibieron doxiciclina y fueron instilados con solución salina no desarrollaron fibrosis, pues no hay presencia de fibras de colágeno ni presentan lesión alguna. Por lo que podemos asumir que la doxiciclina por sí sola no tiene ningún efecto fibrótico.

El grupo de ratones WT y *Sftpc-Mmp14-cKO* que, si fueron instilados con bleomicina, pero no recibieron el estímulo de doxiciclina; se puede apreciar la presencia de fibras colágena y la deformación de los alveolos debido a la extensión de la lesión fibrótica aunque sin diferencias considerables entre ambos grupos

(Figura 10A).

El tercer grupo de ratones grupo de ratones tanto WT como Sftpc-Mmp14-cKO que, si fueron instilados con bleomicina y además si recibieron el estímulo de doxiciclina se puede apreciar una mayor acumulación de fibras de colágena en el grupo de ratones condicionales en comparación con el grupo WT, además de presentar lesiones más extensas. Por otro lado, si comparamos este grupo de ratones con sus controles encontramos una mayor presencia de fibras de colágena y mayor extensión de la lesión en este grupo que no expresa la Mmp14 en las CEA II y que fue instilado con bleomicina, lo que nos haría suponer que la ausencia de la Mmp14 tiene un efecto en el desarrollo de la fibrosis pulmonar. Por lo que cuantificamos el acumulamiento de colágena bioquímicamente, midiendo el contenido de hidroxiprolina, un aminoácido que constituye aproximadamente del 12% al 15% de los aminoácidos que componen la triple hélice de colágena y cuya prevalencia en otras proteínas es escasa. Primero medimos el contenido de hidroxiprolina del ratón Sftpc-Mmp14-cKO sin doxiciclina y con doxiciclina comparándolo con su contraparte, un ratón WT de la cepa c57BL6 en las mismas condiciones, para evaluar si la modificación genética por sí misma causaba una mayor síntesis de colágena, sin embargo, no se encontraron diferencias en ninguna de las condiciones, lo que nos sugiere, que tanto el background genético del ratón, así como el tratamiento con doxiciclina no tienen ningún efecto en el acumulamiento de colágena (Figura 10B). Por otro lado, cuando cuantificamos el contenido de hidroxiprolina en pulmones de los ratones Sftpc-Mmp14-cKO con el estímulo de doxiciclina y sin doxiciclina instilados y su contraparte WT instilados con bleomicina 21 días antes, pudimos constatar que el ratón Sftpc-Mmp14-cKO presenta una mayor acumulamiento de colágena, corroborando lo antes revelado en el análisis morfológico con la tinción de Masson, un mayor contenido de colágena en los pulmones de los ratones Sftpc-Mmp14-cKO sin Mmp14 instilados con bleomicina en comparación con sus controles Sftpc-Mmp14-cKO y el WT (Figura 10 A y B), los cuales sus CEAll si expresaban MMP14 (139 ± 18 vs 89 ± 5 ug/pulmón $p < 0.01$ respectivamente), indicando la que delección de Mmp14 en las CEAll provoca un mayor acumulamiento de colágena en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por

bleomicina.

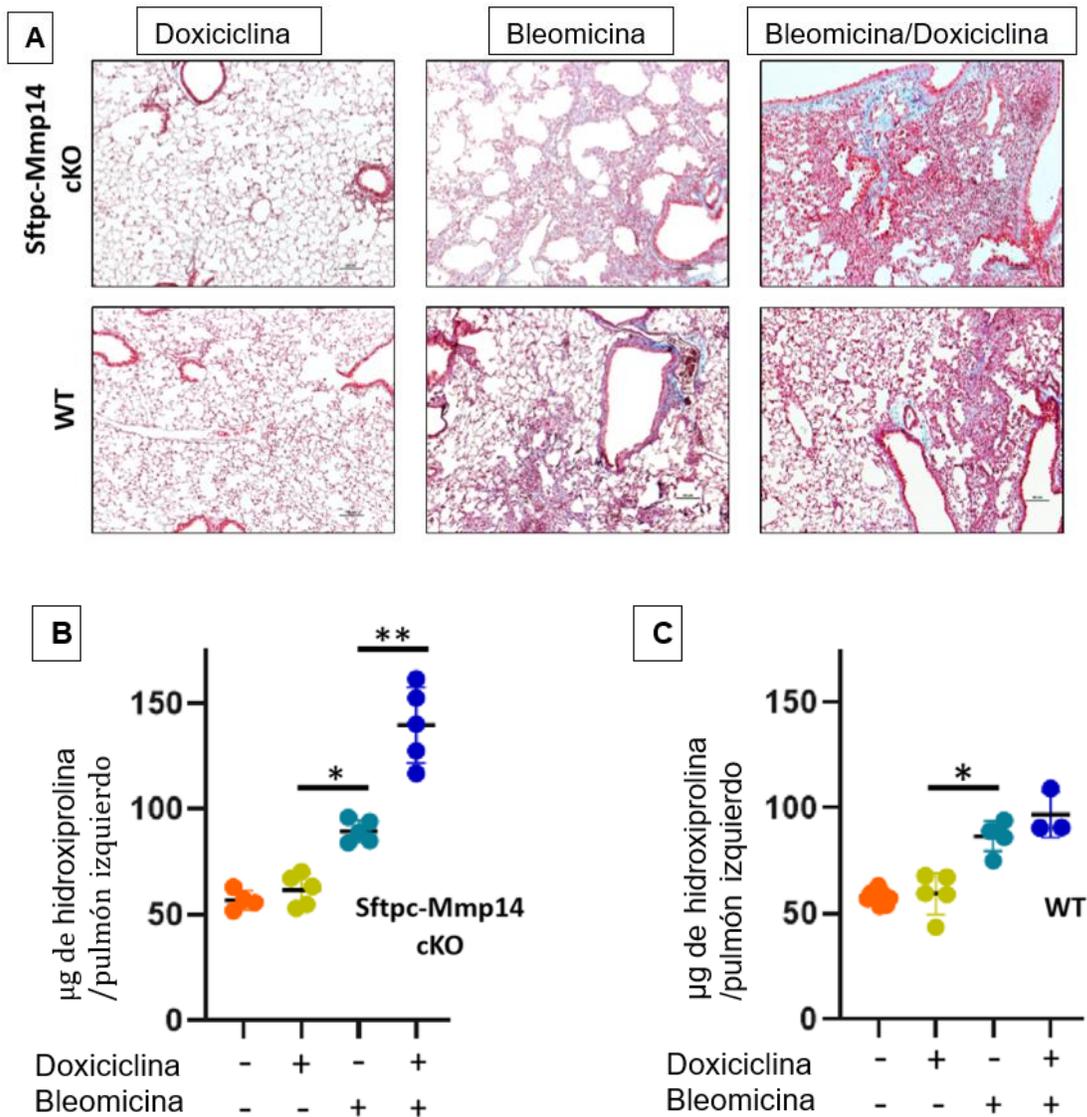


Figura 10. Análisis histológico y cuantificación de hidroxiprolina de ratones WT y Sftpc-Mmp14-cKO con y sin el estímulo de doxiciclina a 21 días. (A) Análisis histológico por medio de la tinción tricromica de Masson de ratones WT y Sftpc-Mmp14-cKO con y sin el estímulo de doxiciclina en condiciones basales, con bleomicina y el estímulo de doxiciclina/bleomicina. (B) Cuantificación de hidroxiprolina en ratones Sftpc-Mmp14-cKO con y sin el estímulo de doxiciclina condiciones basales, con bleomicina y el estímulo de doxiciclina/bleomicina (C) Cuantificación de hidroxiprolina en ratones WT en condiciones basales, con

bleomicina y el estímulo de doxiciclina/bleomicina $**p < 0.01$ por ANOVA $n \geq 3$.

-Etapa de resolución de la fibrosis (120 días post instilación)

En esta fase de resolución nosotros mantuvimos los grupos de ratones los Sftpc-Mmp14-cKO y WT con la instilación única de bleomicina sin el estímulo doxiciclina y con el estímulo de doxiciclina durante 120 días, cabe recalcar que los ratones con el estímulo de doxiciclina lo recibían cada dos semanas. Pasado este tiempo los ratones fueron eutanizados y se analizaron histológicamente observando que los grupos control Sftpc-Mmp14-cKO con bleomicina sin el estímulo de doxiciclina y con doxiciclina presentaron una resolución de la fibrosis casi a niveles basales del WT. Sin embargo, los ratones Sftpc-Mmp14-cKO con la Mmp14 deletada mostraron una resolución incompleta, con una regresión parcial de la extensión de la lesión ($25 \pm 12\%$ vs $7.5 \pm 5\%$ respecto al grupo control) (Figura 11 A); así como un mayor contenido de hidroxiprolina en comparación con los niveles del control (111 ± 8 vs $66 \pm 10 \mu\text{g}/\text{pulmón}$ $p < 0.01$) indicando que la deficiencia de Mmp14 en las CEAll también afecta la etapa de resolución de la fibrosis pulmonar (Figura 11 B y C).

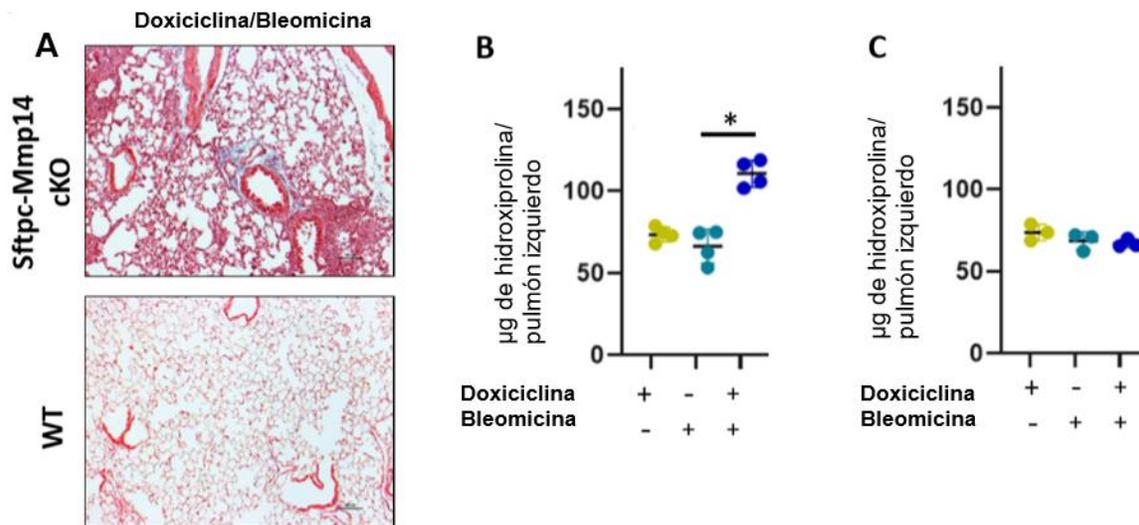


Figura 11. Análisis histológico y cuantificación de hidroxiprolina en la etapa de resolución (120 días). (A) Análisis histológico por medio de la tinción tricromica de Masson de ratones Sftpc-Mmp14-cKO con estímulo de doxiciclina/bleomicina y ratones WT con bleomicina a 120 días. Cuantificación de hidroxiprolina en ratones

Sftpc-Mmp14-cKO (B) y WT (C) con y sin el estímulo de doxiciplina y bleomicina a 120 días **p< 0.01 por ANOVA n≥ 3.

Transfección de MMP14 en células A549

Para evaluar el efecto de MMP14 *in vitro*, se transfectaron a la par CEAll humanas de la línea celular A549. Se utilizo el RNA de horquilla corta 5 shRNAMT1-MMP para un silenciamiento específico constitutivo de MMP14, a las que llamaremos shMMP14 y a su vector control shCtrl; así como un vector de sobre expresión de MMP14 pCMV6-ACGFP+MMP14, mismas que llamaremos +MMP14 y su control de transfección Mock.

Para corroborar la eficacia de nuestras transfecciones en las células A549 con los vectores de silenciamiento y sobre expresión se midió la síntesis de MMP14 por medio de la técnica de Western Blot. Ambos vectores controles shctrl y Mock no presentaron diferencias de expresión de MMP14; en cuanto a las células transfectadas con el vector de silenciamiento shMMP14 presentaron una disminución del 95% de MMP14 en comparación con su vector control; por ultimo las células a las que se les sobre expreso MMP14 con el vector +MMP14 presentaron un aumento de la síntesis de MMP14 del 90% en comparación de su vector control (Figura 12).

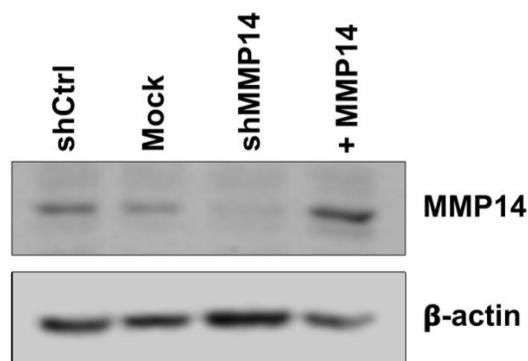


Figura 12. Síntesis de MMP14 en células transfectadas. Western Blot de células de la línea A549 con los vectores shctrl y Mock los cuales no tuvieron diferencias entre sí, en el tercer carril se encuentra la proteína de las células transfectadas con el

vector de silenciamiento shMMP14, donde se puede observar la MMP14 silenciada y en el cuarto carril muestra MMP14 sobre expresada en las células transfectadas con el vector de expresión. Nuestro control de carga fue β -actina.

La senescencia epitelial es uno de los mecanismos que incrementan la actividad fibrogénica *in vitro* y agrava la fibrosis pulmonar *in vivo*. Dado que el arresto celular es uno de los mecanismos clave en la senescencia celular, nosotros evaluamos si MMP14 tenía algún efecto en la tasa de crecimiento en las células epiteliales alveolares shMMP14 y +MMP14. Se midió la tasa de crecimiento por medio del método WST a distintos tiempos; 24, 48 y 72hrs, teniendo como resultado un incremento de esta en las células que sobre expresan la MMP14, mientras que las células shMMP14 decrecía a las 48 y 72hrs respecto con sus controles (Figura 13).

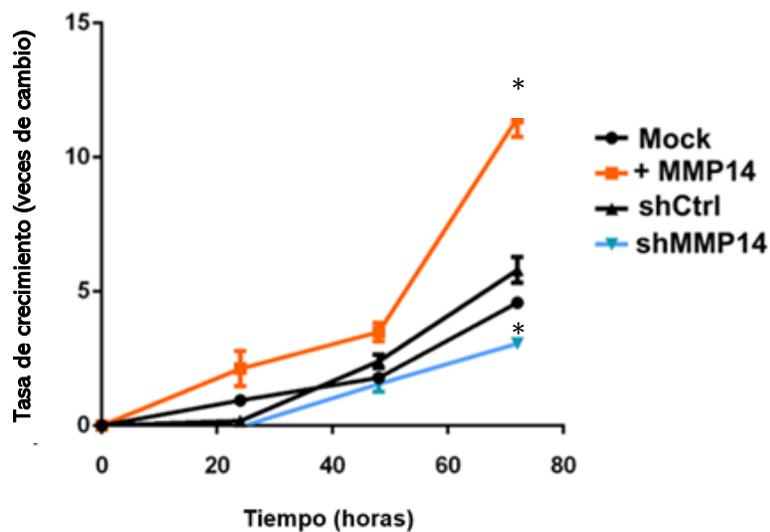
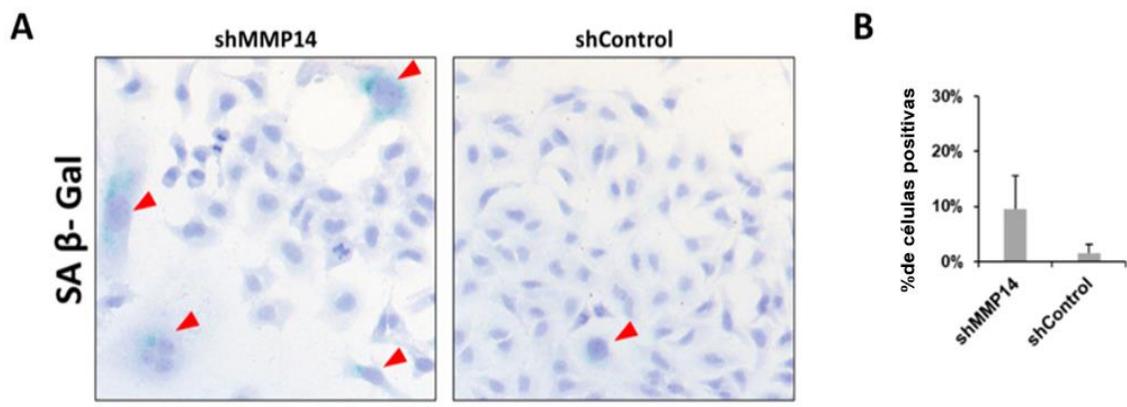


Figura 13. Tasa de proliferación por el método WST. Ensayo de proliferación de células A549 silenciadas de MMP14 y sobre expresadas de MMP14, así como sus respectivos controles a 24, 48 y 72 horas en medio F-12 al 1%. Se puede observar una menor tasa de proliferación por parte de las células con la MMP14 silenciada a 48 y 72 horas. La grafica es el promedio de tres experimentos independientes por triplicado. $P < 0.01$

La ausencia de la MMP14 en células epiteliales promueve de senescencia *in vitro*.

La senescencia es un proceso en el que las células entran en un arresto celular y dejan de dividirse de manera permanente, pero no mueren (resistencia a apoptosis), este arresto celular puede ser causado por diversos tipos de estrés como daño al DNA, telómeros disfuncionales o exposición a algunas moléculas como peróxido de hidrogeno o doxorubicina. Cabe resaltar que estas células son activas y liberan sustancias que pueden causar inflamación, dañar las células vecinas o como se ha observado en la FPI aumentar la proliferación y activación de fibroblastos. Existe evidencia que en células epiteliales alveolares de pacientes con FPI se puede encontrar la expresión de las proteínas p21 y p53, mismas que son de gran relevancia en la senescencia celular. p53 promueve la senescencia activando genes que inhiben la proliferación, incluyendo el inhibidor de cinasas dependientes de ciclina p21/Cip1/Waf1, previniendo la proliferación celular bajo ciertas circunstancias de estrés celular. p21 es otro inhibidor del ciclo celular, pero este es dependiente a nivel transcripcional de p53. Una vez que p21 es activado inhibe directamente la actividad de las enzimas de los complejos ciclina-CDK2 y ciclina-CDK4 (del inglés cyclin-dependent kinase inhibitor).

Ahora bien, teniendo en cuenta que la senescencia puede tener un papel clave en la fibrosis pulmonar, decidimos probar si este proceso se presentaba de manera espontánea en nuestras células shMMP14 por medio del marcador de asociado a senescencia β -galactosidasa (SA β -Gal), ya que estas células presentaban una menor tasa de proliferación (Figura 13). Encontramos un incremento en el



porcentaje de células positivas a β -galactosidasa en las células epiteliales con la MMP14 silenciada en comparación con su respectivo control (Figura 14 A y B). Por lo que podríamos considerar la presencia de una senescencia espontánea.

Figura 14. Evaluación de células senescentes por SA β -Gal en células A549 con MMP14 silenciada. (A) células A549 con MMP14 silenciada y su control positivas a la tinción de SA β -Gal (flechas rojas). (B) Porcentaje de células positivas a SA β -Gal. Podemos observar un mayor porcentaje de células positivas a SA β -Gal en las A549 con la MMP14 silenciada en condiciones basales.

Para corroborar que la deficiencia de MMP14 promovía la senescencia en el epitelio alveolar, cuantificamos la expresión de p21 por medio de inmunofluorescencia, observado una mayor expresión de este inhibidor del ciclo celular comparándolo con su control (Figura 15 A y B), así como un aumento de la expresión de γ -H2AX, una variante de la histona H2AX que presenta su residuo de cisteína-139 fosforilado, La detección de esta fosforilación surge como un marcador molecular altamente específico y sensible para monitorear el inicio de daño del DNA (97) (Figura 15 C).

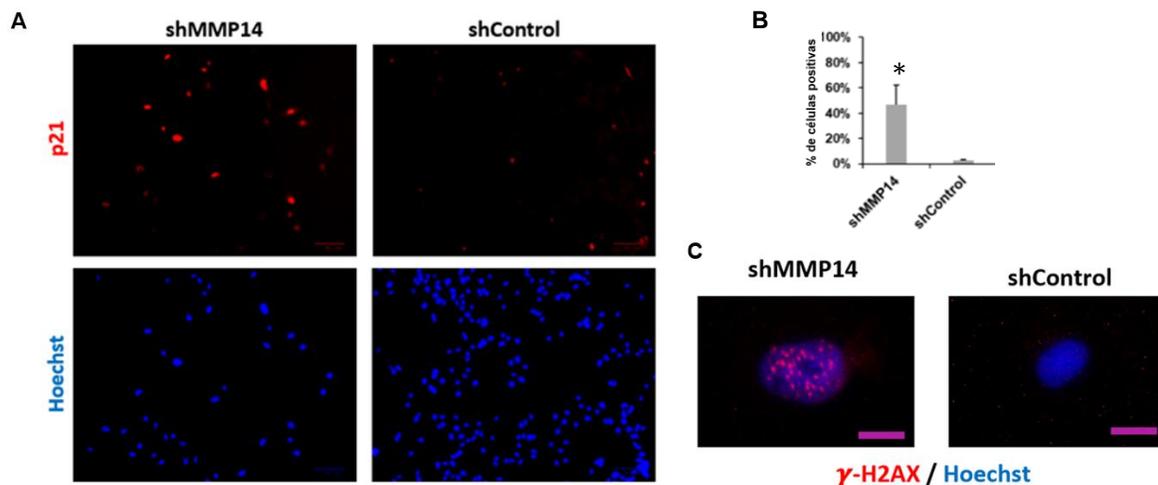


Figura 15. El silenciamiento de MMP14 incrementa los marcadores de senescencia. (A) El silenciamiento de MMP14 incrementa la expresión de p21 por inmunofluorescencia. (B) porcentaje de células positivas a p21 en condiciones

basales de células con MMP14 silenciada comparada con su control. (C) célula con la MMP14 silenciada, la cual expresa γ -H2AX en comparación con su control, el cual no presenta expresión de γ -H2AX

Por lo que, decidimos potencializar la senescencia en las células epiteliales A549 shMMP14 por medio de doxorubicina en dos concentraciones (0.5 μ M y 1.0 μ M). La doxorubicina es un antibiótico utilizado en el tratamiento de una gran variedad de tipos de cáncer, capaz de inducir senescencia (90). Por medio de fluorescencia nosotros fuimos capaces de detectar un incremento de p21 en las células epiteliales shMMP14 con doxorubicina a 0.5 μ M y 1.0 μ M comparación con sus controles sin doxorubicina. (Figura 16 A y B). Adicionalmente medimos por medio de Western blot otros dos marcadores de senescencia p53, γ -H2AX y nuevamente p21 donde evidentemente se observa una mayor expresión de los tres marcadores de senescencia en las células shMMP14 que no expresan la MMP14 (figura 16 C).

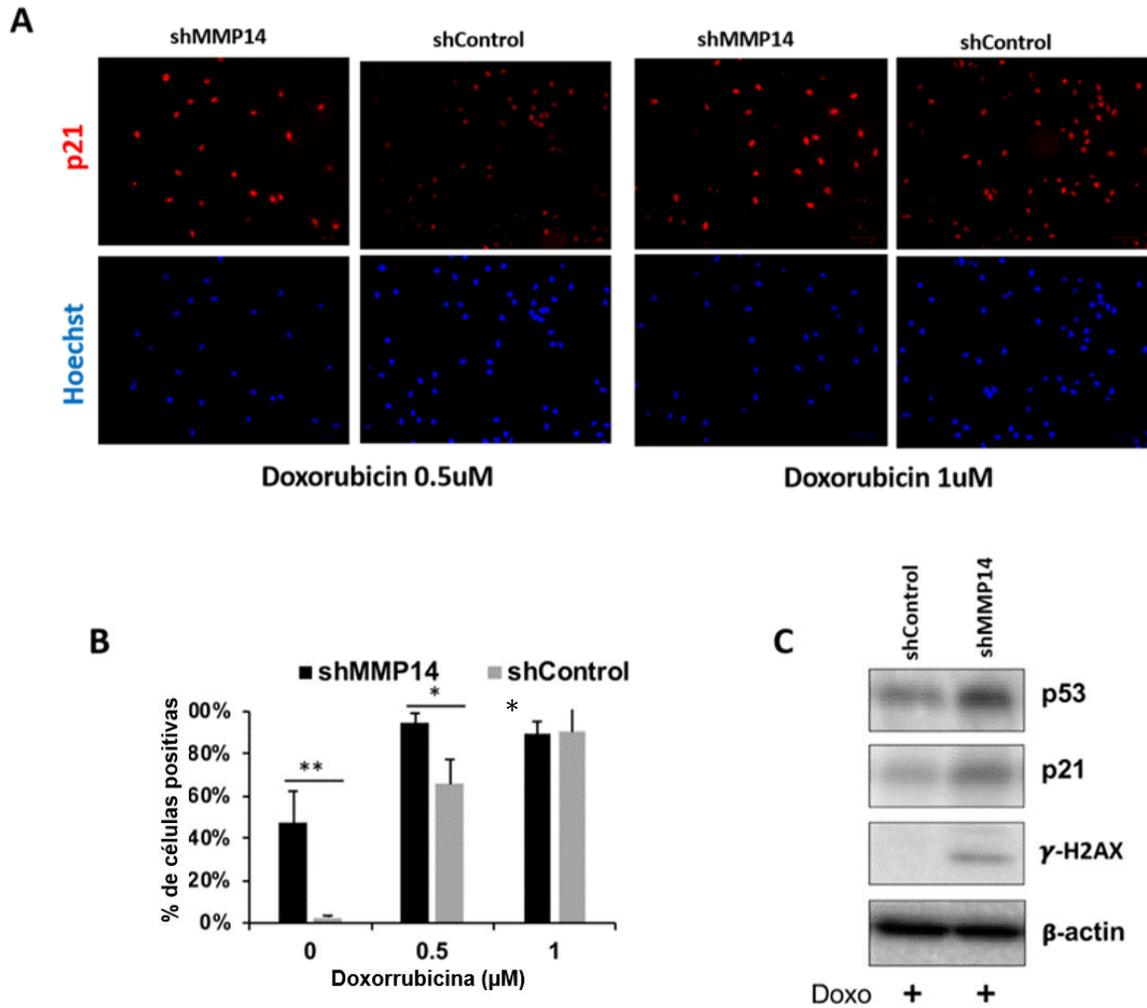


Figura 16. El silenciamiento de MMP14 incrementa la expresión de p21. (A) Inmunofluorescencia después del tratamiento de doxorubicina (Sigma) 0.5uM o 1uM por 48h en medio Ham's F12 con 2% de suero fetal bovino. (B) porcentaje de células positivas a p21 en condiciones basales y después de el tratamiento con doxorubicina a 0.5uM o 1uM en células con la MMP14 silenciada y su respectivo control. (C) Western Blot que evidencia que tras el tratamiento con doxorubicina 1µM incrementa la expresión de p53, p21 y γ H2AX en las células con la MMP14 silenciada comparada con su control.

Las células epiteliales shMMP14 sobre expresan TGF- β e incrementan marcadores profibróticos en fibroblastos. Resumiendo un poco; nosotros demostramos que el ratón deficiente de Mmp14 en las CEA II presenta un incremento en la respuesta fibrótica en el modelo de fibrosis

pulmonar inducida por bleomicina, la cual está relacionada con una activación y diferenciación de fibroblastos, así como la sobre expresión de TGF- β 1. Asimismo, *in vitro* las células las células shMMP14 que no expresan MMP14 presentan un fenotipo senescente. Asumiendo ambos resultados y tratando de elucidar el papel de la MMP14 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, decidimos medir la expresión de TGF- β 1 en nuestras células shMMP14 senescentes (0.47 ± 0.12) en condiciones basales. Desde antes de poner el estímulo de doxorubicina pudimos observar un incremento en la expresión de TGF- β 1 en nuestras células silenciadas no senescentes (0.72 ± 0.3), además al aumentar la doxorubicina a $1 \mu\text{gM}$ se observó que las células no senescentes aumentaban más la expresión de TGF- β 1 (1.14 ± 0.2) en comparación con las células senescentes que prácticamente mantenía los niveles basales (0.48 ± 0.05). (Figura 17A).

Así que decidimos explorar de qué manera las células epiteliales shMMP14 senescentes podrían tener un efecto sobre los fibroblastos, tratando de simular lo que pasaría en un pulmón fibrótico, nosotros pusimos a crecer fibroblastos provenientes de un donador sano con medio condicionado con $1 \mu\text{g}$ de doxorubicina de las shMMP14 senescentes al 25% durante 12 y 48 horas. Pasados los tiempos se extrajo el RNA de los fibroblastos para cuantificar la expresión de la α -actina de músculo liso y fibronectina ambas moléculas sobre expresadas en fibroblastos extraídos de pacientes con FPI. La expresión tanto de la α -actina de músculo liso y fibronectina que detectamos en los fibroblastos bajo el estímulo del medio condicionado de las células shRNA senescentes (α -actina 12hrs 2.3 ± 0.15 , 48hrs 7.6 ± 3.2) (FN 12hrs 1.8 ± 0.001 , 48hrs 2.4 ± 0.8) fue mayor que en los controles que no fueron estimulados con el medio de las nuestras células senescentes (α -actina 12hrs 1.0 ± 1.0 , 48hrs 2.7 ± 4.0) (FN 12hrs 1.1 ± 0.001 , 48hrs 1.3 ± 0.2) (Figura 18 B y C). Por lo que podríamos suponer que la senescencia aumentada por la ausencia de la MMP14 en las células epiteliales puede tener un efecto en la diferenciación de fibroblastos.

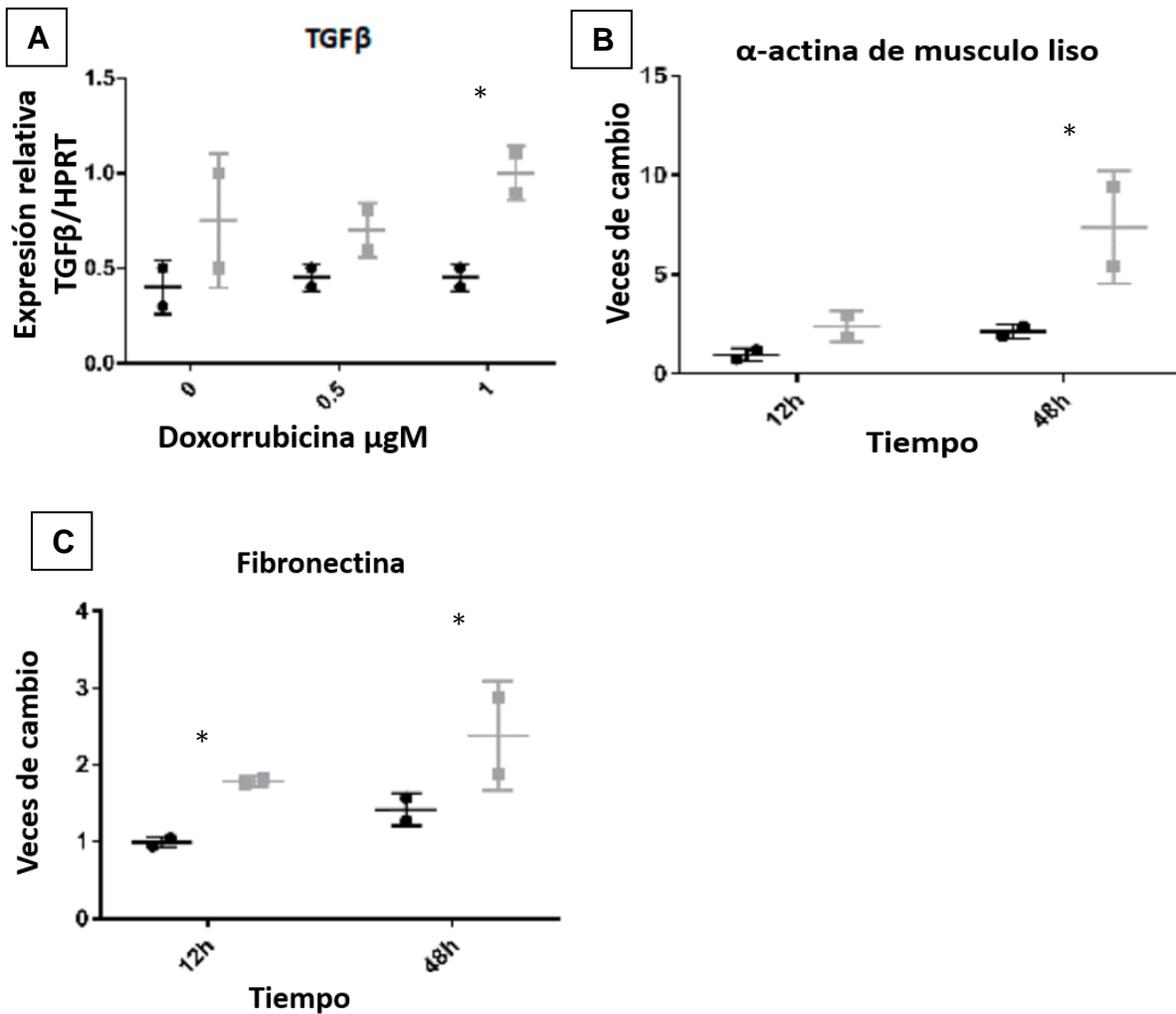


Figura 17. Las células epiteliales senescentes sobre expresan TGF β 1 e incrementan marcadores pro fibróticos en fibroblastos. (A) Expresión de TGF β 1 en condiciones basales y después del estímulo de doxorubicina. (B y C) Efecto del medio condicionado de las células shMMP14 senescentes por doxorubicina 1 μM al 25% sobre fibroblastos normales de pulmón a 12 y 48 horas, midiendo la expresión por PCR tiempo real de α -actina de músculo liso y fibronectina respectivamente.

Discusión

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad pulmonar crónica, progresiva, irreversible y letal de etiología desconocida; relacionada con el envejecimiento (2,3). Donde ocurre la pérdida del parénquima pulmonar siendo reemplazado por tejido

fibrótico. Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la FPI, tradicionalmente la FPI se trataba como una enfermedad que proviene de un proceso inflamatorio no resuelto. Sin embargo, existe fuerte evidencia clínica y experimental que indica que esta enfermedad es causada por un desorden epitelial, mismo que es resultado de la interacción de la predisposición genética del individuo y otros factores de riesgo. En este contexto, es de suma importancia entender la conducta molecular del epitelio y así poder hallar los mecanismos implicados en la iniciación y progresión de la FPI (13).

Las MMPs son una familia de endopeptidasas, las cuales en las últimas décadas han emergido como reguladores críticos de la homeostasis pulmonar; así como de distintas patologías como la FPI, ya sea teniendo un rol anti fibrótico o siendo implicadas en procesos pro fibróticos (1,68). Dentro del contexto de la FPI una de las MMPs más expresada, pero más difícil de estudiar es la MMP14; por medio de secuenciación, esta enzima se ha reportado sobre expresada a nivel de RNA y proteína en células epiteliales alveolares (95,107).

Por otro lado, en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se tiene reportado que MMP14 es expresada a nivel proteína en células epiteliales alveolares (91,98,99), además de estar sobre expresada en la etapa de inflamación y resolución de la fibrosis inducida por bleomicina en ratones de la cepa c57bL6 (94). Estos resultados nos llevaron a considerar que la expresión de MMP14 en el epitelio alveolar podría estar relacionada en la biopatología de la fibrosis pulmonar.

Como ya se mencionó la MMP14 es una enzima ampliamente expresada en la fibrosis y varias otras patologías como el cáncer, aunque esclarecer el rol que tiene en estas es muy complicado, ya que el ratón *Mmp14*KO es el único letal de toda la familia de las *Mmps*, por lo que no se puede montar el modelo de fibrosis pulmonar inducida en este organismo (89,90). Sin embargo, actualmente existen herramientas que nos permiten generar ratones KO condicionales, a los cuales les podemos deletar alguna molécula de interés en el momento que deseemos, bajo condiciones específicas. Por lo que nosotros generamos un ratón condicional de la *Mmp14*, el cual bajo un tratamiento con doxiciclina presenta la delección específica

de esta enzima en las células alveolares tipo II (CEAII). Este ratón no presenta problemas en el desarrollo, crecimiento ni reproducción o un fenotipo en particular en el pulmón al igual que al administrarle doxiciclina por medio del agua que pudieran modificar el análisis del modelo de bleomicina. Una vez que nos aseguramos de la delección de Mmp14 en las CEAII, se montó el modelo de fibrosis evaluando el papel de esta enzima en cada una de las etapas del modelo. Aunque se tiene reportado por medio de un análisis de microarreglos que la Mmp14 se encuentra sobre expresada en la etapa inflamatoria y de resolución de la fibrosis en el modelo de bleomicina, nosotros no encontramos diferencias en la etapa de inflamatoria entre el ratón Mmp14-cKO con doxiciclina y bleomicina que no expresa Mmp14 y el Mmp14-cKO sin doxiciclina y bleomicina que expresa Mmp14, cabe recalcar que la expresión reportada en esta fase del modelo se midió en pulmón total, además de que la expresión Mmp14 no solo se limita a las células alveolares tipo II, ya que una gran cantidad de tipos celulares expresan a esta enzima, por lo que la sobre expresión en el modelo antes reportado podría ser asociado a otros tipos celulares distintos a las CEAII durante la etapa inflamatoria. Notablemente en la etapa fibrótica el ratón condicional con doxiciclina y bleomicina presento una fibrosis pulmonar intersticial más exacerbada, así como un mayor acumulamiento de colágena en comparación con su igual sin doxiciclina y bleomicina y su contraparte WT. Además, durante la etapa de resolución presento una resolución más retardada en comparación con los controles. Resultados similares se han reportado en el ratón condicional, específicamente en fibroblastos estromales, donde la delección de Mmp-14 en los fibroblastos induce un fenotipo de piel adulta fibrótica, mientras el engrosamiento dérmico disminuyó en ratones WT después de un período de reposo (99,100). De todas las Mmps de ratón solo algunas son capaces de degradar colágena tipo I, de estas la más expresada en la fibrosis pulmonar inducida en ratón es Mmp14, misma que pertenece a una subfamilia de metaloproteinasas asociadas a membrana, esta MMP es clave en la degradación peri celular de las colágenas fibrilares tipo I y III, además de la activación de MMP2, siendo una poderosa colagenasa necesaria para la migración celular (101,102). Por lo que la deficiencia de esta enzima puede contribuir a agravar la respuesta fibrótica,

así como retardar el tiempo de resolución de la fibrosis al tener poca degradación de colágena.

Cabe mencionar que los efectos de la deficiencia de Mmp14 específicamente en las CEAll en la fibrosis eran desconocidos y poco relacionados con la actividad colagenolítica intersticial. En este contexto se ha demostrado que el procesamiento proteolítico anormal de la MEC que ocurre en el ratón Mmp14KO desencadena vías de señalización que inducen la senescencia celular a través de alteraciones severas en la arquitectura nuclear y el citoesqueleto. Además, cuando existe o aumenta la actividad proteolítica de Mmp14 la inducción del programa senescencia se ve reducido, lo que indica que una remodelación anormal de la MEC puede activar la senescencia celular (103,104,105).

En los últimos años, una gran cantidad de evidencia indica que la acumulación aberrante de células senescentes epiteliales, un sello distintivo del envejecimiento se asocia con un empeoramiento de la fibrosis y otros efectos perjudiciales sobre la homeostasis pulmonar (106). La senescencia es un proceso caracterizado por un arresto celular, resistencia a la apoptosis, alta actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia y la secreción citocinas y quimiocinas proinflamatorias, factores angiogénicos y MMPs que causan cambios en el microambiente local (41).

Bajo estos argumentos, decidimos sobre expresar y silenciar MMP14 en células humanas epiteliales alveolares tipo II de la línea celular A549 para evaluar la senescencia celular. Nosotros decidimos no usar células alveolares de ratón porque estas células no proliferan *in vitro*, por lo que estas células solo fueron usadas para comprobar la delección del gen Mmp14 en nuestro ratón. Exitosamente deletamos MMP14 por medio de un RNA de horquilla en las células A549, las cuales al comparar su tasa de proliferación con las células que sobre expresaban MMP14 observamos que conforme pasaba el tiempo disminuía la capacidad proliferativa en las células silenciadas de MMP14, por lo que medimos la actividad de SA β -Gal, así como la acumulación de H2AX un marcador de daño a DNA y p53 las cuales estaban sobre expresadas en estas células que no expresaban MMP14 en condiciones basales. Es bien sabido que la activación de p53 se da por la cascada

de activación que provoca el daño celular, un paso crítico en la inducción de la senescencia celular. Una característica de la senescencia es su irreversible arresto en el ciclo celular; p21, un inhibidor de cinasas, el cual se expresa dependientemente bajo la inducción de p53 y arresta a la célula en la fase G1/S fue otra molécula sobre expresada en nuestras células silenciadas de la MMP14 (98,99,106). Por lo que tal vez la sobre expresión de MMP14 en células alveolares de pacientes con FPI tengan un efecto protector ante el daño al epitelio alveolar, pues recordemos que la senescencia puede desencadenarse bajo algún estrés o daño al epitelio, el cual histológicamente podemos observar rodeando focos de fibroblastos (40), sin dejar de lado que esta senescencia viene acompañada por la secreción de citocinas y quimiocinas pro inflamatorias, factores angiogénicos y MMPs que causan cambios en el microambiente local, los cuales además se ha comprobado que promueven la activación, migración y proliferación de fibroblastos (40,41,43). Lo cual concuerda con nuestras observaciones, pues en nuestras células senescentes silenciadas de la MMP14 expresaban más TGF- β 1 en comparación con sus controles no senescentes, además cuando cultivamos fibroblastos humanos con el medio condicionado de estas células senescentes carentes de MMP14 observamos una mayor expresión de α -actina de músculo liso, la cual es una molécula profibrosante relacionada con la diferenciación y activación de fibroblastos y miofibroblastos, además de que también se detectó en estos fibroblastos una mayor expresión de fibronectina, una molécula de la MEC. Por lo que probablemente en nuestro modelo cuando deletamos a la Mmp14 de las CEAll, la fibrosis se ve aumentada y la resolución retardada, debido a que las CEAll son propensas a la senescencia celular, promoviendo la secreción de moléculas citocinas, quimiocinas y Mmps que promueven la activación y migración de fibroblastos, mismos que van a generar un acumulamiento excesivo de colágenas fibrilares, que no pueden ser degradadas pericelularmente por las CEAll al no tener Mmp14 promoviendo de esta manera la fibrosis pulmonar.

Conclusiones

Se corrobora que MMP14 es expresada en células alveolares epiteliales en pacientes con FPI, específicamente en células alveolares tipo II hiperplásicos cuboidales, ocasionalmente también se localiza expresada por fibroblastos.

La delección de Mmp14 en las células epiteliales tipo II del ratón condicional Mmp14-cKO provoca una mayor fibrosis y un retraso en la resolución de esta, así como un mayor acumulación de colágenas fibrilares en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

La sobre expresión de MMP14 en células alveolares epiteliales tipo II de la línea celular A549 humana promueve la proliferación. Así como la ausencia de MMP14 en células epiteliales alveolares tipo II de la línea celular A549 humana provoca un fenotipo senescente, presentando marcadores de senescencia como SA β -Gal, p21 y el marcador de daño a DNA H2AX en condiciones basales.

Las células A549 senescentes con la MMP14 silenciada sobre expresan TGF- β 1, p53, p21 y H2AX.

Los fibroblastos estimulados con el medio de las células silenciadas de MMP14 senescentes sobre expresan moléculas pro fibrosantes como α -actina de musculo liso y fibronectina.

Los resultados de este trabajo demuestran que la deficiencia de MMP14 exacerba la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y afecta de manera negativa la resolución de esta. Además, que el mecanismo por el cual ocurre esto aparentemente es un proceso asociado con la inducción de la senescencia epitelial.

Referencias bibliográficas

- 1.-Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134:136- 151. 2001
- 2.-Pardo A. Selman M. Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc*,3:383-388. 2006
- 3.-Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Frontiers in Bioscience* 7:1743 1761. 2002
- 4.- D'Alessandro-Gabazza CN, Kobayashi T, Yasuma T, Toda M, Kim H, Fujimoto H, Hataji O, Takeshita A, Nishihama K, Okano T, Okano Y, Nishii Y, Tomaru A, Fujiwara K, D'Alessandro VF, Abdel-Hamid AM, Ren Y, Pereira GV, Wright CL, Hernandez A, Fields CJ, Yau PM, Wang S, Mizoguchi A, Fukumura M, Ohtsuka J, Nosaka T, Kataoka K, Kondoh Y, Wu J, Kawagishi H, Yano Y, Mackie RI, Cann I, Gabazza EC. A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis. *Nat Commun.*;11(1):1539. 2020
- 5.-Cabrera S, bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar. *Rev. Inst Nal enf Resp Mex*; 19-1 53-61. 2006
- 6.- Matute-Bello G, Frevert C, Martin T, Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295 : L379-L399. 2008
- 7.- Selman M, Pardo A. The leading role of epithelial cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Signal.* 66:109482, 2019.
- 8.-Huax F, Iouahead J, Hudspith B, Meredith C, Delos M, Renauld JC. Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:51-9. 1998

- 9.- Munger JS, Huang X, Kawajatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin $\alpha 6 \beta 6$ binds and activates latent TGF- $\beta 1$: a molecular for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* ;96:319-28.1999.
- 10.- King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. ;378(9807):1949-1961. 2011
- 11.- Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell numbers and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis.* ,126:332-7. 1982
- 12.- Chroneos ZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL. Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cell Physiol Biochem*; 25:13-26. 2010
- 13.- Pérez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*;1778:1676-95. 2008
- 14.- Guillot L, Nathan N, Tabary O, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*; 45(11):2568-2573. 2013
- 15.- Tamò L, Hibaoui Y, Kallol S. Generation of an alveolar epithelial type II cell line from induced pluripotent stem cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018;315(6):L921-L932. 2017
- 16.- Sheppard D. Epithelial-mesenchymal interactions in fibrosis and repair. Transforming growth factor- β activation by epithelial cells and fibroblasts. *Ann Am Thorac Soc*. 1:S21-3. 2015
- 17.- Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- β Signaling in Lung Health and Disease. *Int J Mol Sci*. Aug 20;19(8). pii: E2460. 2018
- 18.- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*.;15(3):178-196. 2011
- 19.- Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med*.

;62:44-62. 2017

20.- Selman M, Pardo A. Alveolar epithelial cell disintegrity and subsequent activation: a key process in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 186(2):119-121. 2012

21.- . Zhang X, Zhang Y, Tao B, Teng L, Li Y, Cao R, Gui Q, Ye M, Mou X, Cheng H, Hu H, Zhou R, Wu X, Xie Q, Ning W, Lai M, Shen H, Feng GS, Ke Y. Loss of Shp2 in alveoli epithelia induces deregulated surfactant homeostasis, resulting in spontaneous pulmonary fibrosis. *FASEB J.* Jun;26(6):2338-50. 2012

22.- Lawson WE, Polosukhin VV, Stathopoulos GT, Zoia O, Han W, Lane KB, Li B, Donnelly EF, Holburn GE, Lewis KG, Collins RD, Hull WM, Glasser SW, Whitsett JA, Blackwell TS. Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin. *Am J Pathol.*;167(5):1267-77. 2005

23.- Katzen J, Wagner B, Venosa A, Kopp M, Tomer Y, Russo S, Headen A, Basil M, Stark J, Mulugeta S, Deterding R, Beers M. An SFTPC BRICHOS mutant links epithelial ER stress and spontaneous lung fibrosis. *JCI Insight*; 4(6):126125. 2019

24.- . Nureki SI, Tomer Y, Venosa A, Katzen J, Russo SJ, Jamil S, Barrett M, Nguyen V, Kopp M, Mulugeta S, Beers MF. Expression of mutant Sftpc in murine alveolar epithelia drives spontaneous lung fibrosis. *J Clin Invest.* 31;128(9):4008-4024. 2018

25.- Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med*, 208, 1339–1350. 2011

26.- Barkauskas C, Noble P. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 306, C987–C996. 2014

27.- Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc.*;3(4):364-372. 2006

- 28.- Noble P, Barkauskas C, Jiang D. Pulmonary fibrosis: Patterns and perpetrators. *J. Clin. Investig.* 122, 2756–2762. 2012
- 29.- . Sisson, T, Mendez M, Choi K, Subbotina N, Courey A, Cunningham A, Dave A, Engelhardt J, Liu X, White E. Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 181, 254–263. 2010
- 30.- Van Der Velden J, Alcorn J, Chapman D. Airway epithelial specific deletion of Jun-N-terminal kinase 1 attenuates pulmonary fibrosis in two independent mouse models. *PLoS One*;15(1):e0226904. 2020
- 31.- . Peng D, Si D, Zhang R, Liu J, Gou H, Xia Y, Tian D, Dai J, Yang K, Liu E, Shi Y, Lu QR, Zou L, Fu Z. Deletion of SMARCA4 impairs alveolar epithelial type II cells proliferation and aggravates pulmonary fibrosis in mice. *Genes Dis.* 25;4(4):204-214. 2017
- 32.- Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 295(3):L379-99. 2008
- 33.- . Naikawadi RP, Disayabutr S, Mallavia B, Donne ML, Green G, La JL, Rock JR, Looney MR, Wolters PJ. Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis. *JCI Insight.* 8;1(14):e86704. 2016
- 34.- Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, Meldrum E, Sanders YY, Thannickal VJ. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med.*; 6:231. 2014
- 35.- Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol.*;75:685-705. 2013
- 36.- Chen X, Shi C, Meng X, Zhang K, Li X, Wang C, Xiang Z, Hu K, Han X. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuating the expression of TGF- β 1 and FGF-2. *Exp Mol Pathol.*; 101:22. 2016
- 37.- Xiang C, Hongyang X, Jiwei H, Hui W, Yi Z, Hui L, Hourong C, Xiaodong H,

Jinghong D. Epithelial Cell Senescence Induces Pulmonary Fibrosis Through Nanog-mediated Fibroblast Activation. *Aging*. 31;12(1):242-259. 2019

38.- Swinehart IT, Badylak SF. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. *Dev Dyn*. 245(3):351-360. 2016

39.- Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J*.;286(15):2830-2869. 2019

40.- Faner R, Rojas M, Macnee W, Agustí A. Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15;186(4):306-13. 2012

41.- Selman M, Rojas M, Mora AL, Pardo A. Aging and interstitial lung diseases: unraveling an old forgotten player in the pathogenesis of lung fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*.;31(5):607-17.2010

42.- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 6;153(6):1194-217. 2013

43.-Pardo A, Selman M. The Interplay of the Genetic Architecture, Aging, and Environmental Factors in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 64(2):163-172. 2021.

44.- Perez-Tamayo R. Morphostasis: Regulation of Structure. *Estud Med Biol*; 145–161. 1974

45.- . Fernandes D, Bonacci Stewart A. Extracellular Matrix, Integrins, and Mesenchymal Cell Function in the Airways. *Curr Drug Targets* 7 (5): 567-577. 2006

46.- Genovese F, Karsdal MA. Protein degradation fragments as diagnostic and prognostic biomarkers of connective tissue diseases: understanding the extracellular matrix message and implication for current and future serological biomarkers. *Expert Rev Proteomics*;13(2):213-225. 2016

- 47.- Parker MW, Rossi D, Peterson M, et al. Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *J Clin Invest.*;124(4):1622-1635. 2014
- 48.- Visse R and Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *J Am Heart Asso* 92: 827-839. 2003
- 49.- Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.*;331(1-2):134-140. 1993
- 50.- Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.*;1477(1-2):267-283. 2000
- 51.- Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.*;147:1-73. 2017
- 52.- Cruz-Munoz W, Khokha R. The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis. *Crit Rev Clin Lab Sci.*;45(3):291-338. 2008
- 53.- Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie.*;87(3-4):249-263. 2005
- 54.- Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 4(6):216. 2003
- 55.- Selman M, Pardo A. Fibroageing: An ageing pathological feature driven by dysregulated extracellular matrix-cell mechanobiology. *Ageing Res Rev.*;70:101393. 2021
- 56.- Overall CM, McQuibban GA, Clark-Lewis I. Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics. *Biol Chem.*;383(7-8):1059-1066. 2002

- 57.- Nagase H, Visse R and Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardio Res* 69: 5562-563. 2006
- 58.- Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol*; 44-46:207-23. 2015
- 59.- Limb GA, Matter K, Murphy G, et al. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *Am J Pathol.*;166(5):1555-1563. 2005
- 60.- Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation.*;106(12):1543-1549. 2002
- 61.- Luo D, Mari B, Stoll I, Anglard P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.*;277(28):25527-25536. 2002
- 62.- Maldonado M, Salgado-Aguayo A, Herrera I, et al. Upregulation and Nuclear Location of MMP28 in Alveolar Epithelium of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.*;59(1):77-86. 2018
- 63.- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.*;17:463-516. 2001
- 64.- Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol.* 44-46:191-199. 2015
- 65.- Geng R, Xu Y, Hu W, Zhao H. Geng R, Xu Y, Hu W, Zhao H. The association between MMP-1 gene rs1799750 polymorphism and knee osteoarthritis risk. *Biosci Rep.* 19;38(5). 2018
- 66.- Leal MF, Caires Dos Santos L, Martins de Oliveira A. Epigenetic regulation of metalloproteinases and their inhibitors in rotator cuff tears. *PLoS One.* 2;12(9). 2017

- 67.- Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal.*;1(27). 2008
- 68.- Pardo A, Cabrera S, Maldonado M, Selman M. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 17:23. 2016
- 69.- Yu G, Kovkarova-Naumovski E, Jara P, Parwani A, Kass D, Ruiz D, Lopez-Otín C, Rosas I, Gibson K, Cabrera S, Ramírez R, Samuel A. Yousem, Thomas J. Richards, Chensny L, Selman M, Kaminski N, Pardo A. Matrix Metalloproteinase-19 Is a Key Regulator of Lung Fibrosis in Mice and Humans. *Am J Respir Crit Care Med* 186, Iss. 8, pp 752–762. 2012
- 70.- Jara P, Calyeca J, Romero Y, Plácido L, Yu G, Kaminski N, Maldonado V, Cisneros J, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Mar 15; 308(6): L511–L522. 2015
- 71.- Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson S, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A, Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 173. pp 188–198 2006
- 72.- Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller R. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *PNAS* 99 (9) 6292-6297. 2002
- 73.- Kaminski N, Allard JD, Pittet JF, et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci.* 97(4):1778-1783. 2000
- 74.- Herrera I, Cisneros J, Maldonado M, Ramírez R, Ortiz-Quintero B, Anso E, Chandel NS, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinase (MMP)-1 induces lung

alveolar epithelial cell migration and proliferation, protects from apoptosis, and represses mitochondrial oxygen consumption. *J Biol Chem.* 6;288(36):25964-75. 2013

75.- Cabrera, S., Gaxiola, M., Arreola, J. L., Ramírez, R., Jara, P., D'Armiento, J., Pardo, A. Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Inter Jour of Biochem & Cell Bio* 39(12), 2324–2338. 2007

76.- García-Prieto, E., González-López, A., Cabrera, S., Astudillo, A., Gutiérrez-Fernández, A., Fanjul-Fernandez, M., Albaiceta, G. M. Resistance to Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in MMP-8 Deficient Mice Is Mediated by Interleukin-10. *PLoS ONE*, 5(10). 2010

77.- Nkyimbeng T, Ruppert C, Shiomi T, Dahal B, Lang G, Seeger W, Okada Y, D'Armiento J, Günther A. Pivotal role of matrix metalloproteinase 13 in extracellular matrix turnover in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2;8(9). 2013

78.- . Cabrera S, Maciel M, Hernández-Barrientos D, Calyeca J, Gaxiola M, Selman M, Pardo A. Delayed resolution of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in absence of MMP13 (collagenase 3). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1;316(5):L961-L976. 2019

79.- Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A: TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment?. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279: L562-L574. 2000

80.- Pardo A, Cabrera S, Maldonado M, Selman M. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 17: 23. 2016

81.- Sato T, Ovejero M, Hou P, Heegaard A, Kumegawa M, Foged N. Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J Cell Sci,* 110 (Pt 5) pp. 589-596. 1997

82.- Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura

S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*. 107: 789–800. 2001

83.- Nakada M, Yamada A, Takino T, Miyamori H, Takahashi T, Yamashita J, Sato H. Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer Res* 61: 8896–8902. 2001

84.- Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 271: 17119–17123. 1996

85.- Gramolelli S, Cheng J, Martinez-Corral I, Vähä-Koskela M, Elbasani E, Kaivanto E, Rantanen V, Tuohinto K, Hautaniemi S, Bower M, Haglund C, Alitalo K, Mäkinen T, Petrova TV, Lehti K, Ojala PM. PROX1 is a transcriptional regulator of MMP14. *Sci Rep*. 22;8(1):9531. 2018

86.- Itoh Y, Ito N, Nagase H, Seiki M. The second dimer interface of MT1-MMP, the transmembrane domain, is essential for ProMMP-2 activation on the cell Surface. *J Biol Chem*, 283, pp. 13053-13062. 2008

87.- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827–839. 2003

88.- Hotary K, Allen E, Brooks P, Datta N, Long M, Weiss S. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell*. 114:33–45. 2003

89.- Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. MT1-

MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*. Oct 1;99(1):81-92. 1999

90.- Chun TH, Sabeh F, Ota I, et al. MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J Cell Biol*;167(4):757-767. 2004

91.- Jeffrey J. Atkinson, Kenn Holmbeck, Susan Yamada, Henning Birkedal-Hansen William C. Parks, and Robert M. Senior. Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Is Required for Normal Alveolar Development. *DEVEL DYNAMIC*. 232:1079 –1090, 2005

92.- . Ye X, Jing Z, Lingzhi S, Yunye N, Ying Z, Si C, Meng Y, Jingyu C, Guo-Wu Z, Qiang L. NOGO-B promotes EMT in lung fibrosis via MMP14 mediates free TGF-beta1 formation. *Oncotarget*. Vol. 8, (No. 41), pp: 71024-71037. 2017

93.- Rowe R, Keena D, Sabeh F, Willis A, Weiss J. Pulmonary fibroblasts mobilize the membrane-tethered matrix metalloprotease, MT1-MMP, to destructively remodel and invade interstitial type I collagen barriers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Nov; 301(5): L683–L692. 2011

94.- García-Alvarez J, Ramirez R, Sampieri CL, et al. Membrane type-matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarco Vasc and Diffuse Lung Dise*. Mar;23(1):13-21. 2006

95.- Sandra Cabrera, Moises Selman, Alfredo Lonzano-Bolaños, Kazuhisa Konishi, Thomas J. Richards, Naftali Kaminski, and Annie Pardo. Gene expression profiles reveal molecular mechanisms involved in the progression and resolution of bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304: L593–L601. 2013

96.- J.F.WoessnerJr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*. May; 93:440-7. 1961

- 97.- Mah L, El-Osta A, Karagiannis T. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24, 679–686. 2010
- 98.- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA. An official ATS/ERS/ JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* ;183:788–824. 2011
- 99.- Xu Y, Mizuno T, Sridharan A, Du Y, Guo M, Tang J, Wikenheiser-Brokamp KA, Perl AT, Funari VA, Gokey JJ, Stripp BR, Whitsett JA. Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight*. Dec 8;1(20). 2016
- 100.- Lehmann M, Korfei M, Mutze K, Klee S, Skronska-Wasek W, Alsafadi HN, Ota C, Costa R, Schiller HB, Lindner M, Wagner DE, Günther A, Königshoff M. Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo. *Eur Respir J*. 50: 1929-1934. 2017
- 101.- Zigrino P, Brinckmann J, Niehoff A, Lu Y, Giebeler N, Eckes B, Kadler KE, Mauch C. Fibroblast-Derived MMP-14 Regulates Collagen Homeostasis in Adult Skin. *J Invest Dermatol*, 136:1575–1583. 2016
- 102.- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, LopezOtin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol*; 167:769–781. 2004
- 103.- Gutierrez-Fernandez A, Soria-Valles C, Osorio FG, Gutierrez-Abril J, Garabaya C, Aguirre A, Fueyo A, Fernandez-Garcia MS, Puente XS, LopezOtin C. Loss of MT1-MMP causes cell senescence and nuclear defects which can be reversed by retinoic acid. *EMBO J*; 34:1875–1888. 2015
- 104.- Mora AL, Rojas M, Pardo A, Selman M. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat Rev Drug Discov*;

16:755–772. 2017

105.- Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, Gil J, Hara E, Krizhanovsky V, Jurk D, Maier AB, Narita M, Niedernhofer L, Passos JF, Robbins PD, Schmitt CA, Sedivy J, Vougas K, von Zglinicki T, Zhou D, Serrano M, Demaria M. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*; 179:813–827. 2019

106.- Kim YY, Jee HJ, Um JH, Kim YM, Bae SS, Yun J. Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence. *Aging Cell*. 16(5):1094-1103. 2017

107.- Maldonado M, Buendía-Roldán I, Vicens-Zygmunt V, Planas L, Molina-Molina M, Selman M, Pardo A. Identification of MMP28 as a biomarker for the differential diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 12;13(9). 2018

108.- Maldonado M, Salgado-Aguayo A, Herrera I, Cabrera S, Ortíz-Quintero B, Staab-Weijnitz CA, Eickelberg O, Ramírez R, Manicone AM, Selman M, Pardo A. Upregulation and Nuclear Location of MMP28 in Alveolar Epithelium of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Jul;59(1):77-86. 2018

109.- Gharib SA, Johnston LK, Huizar I, Birkland TP, Hanson J, Wang Y, Parks WC, Manicone AM. MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol*. 95(1):9-18. 2014

110.- Yamashita CM, Dolgonos L, Zemans RL, Young SK, Robertson J, Briones N, Suzuki T, Campbell MN, Gauldie J, Radisky DC, Riches DW, Yu G, Kaminski N, McCulloch CA, Downey GP. Matrix metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 179(4):1733-45. 2011

111.- Pottier N, Chupin C, Defamie V, Cardinaud B, Sutherland R, Rios G, Gauthier F, Wolters PJ, Berthiaume Y, Barbry P, Mari B. Relationships between early inflammatory response to bleomycin and sensitivity to lung fibrosis: a role for dipeptidyl-peptidase I and tissue inhibitor of metalloproteinase-3? *Am J Respir Crit*

Care Med. 1;176(11):1098-107. 2007

112.- Craig VJ, Polverino F, Laucho-Contreras ME, Shi Y, Liu Y, Osorio JC, Tesfaigzi Y, Pinto-Plata V, Gochuico BR, Rosas IO, Owen CA. Mononuclear phagocytes and airway epithelial cells: novel sources of matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 14;9(5). 2014

113.- García-Prieto E, González-López A, Cabrera S, Astudillo A, Gutiérrez-Fernández A, Fanjul-Fernandez M, Batalla-Solís E, Puente XS, Fueyo A, López-Otín C, Albaiceta GM. Resistance to bleomycin-induced lung fibrosis in MMP-8 deficient mice is mediated by interleukin-10. *PLoS One.* 7;5(10) 2010

114.- Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M, Corbo V, Oni TE, Hearn SA, Lee EJ, Chio II, Hwang CI, Tiriác H, Baker LA, Engle DD, Feig C, Kultti A, Egeblad M, Fearon DT, Crawford JM, Clevers H, Park Y, Tuveson DA. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol.* 109:96–101. 1997

115.- Nkyimbeng T, Ruppert C, Shiomi T, Dahal B, Lang G, Seeger W, Okada Y, D'Armiento J, Günther A. Pivotal role of matrix metalloproteinase 13 in extracellular matrix turnover in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2;8(9). 2013

116.- Nkyimbeng T, Ruppert C, Shiomi T, Dahal B, Lang G, Seeger W, Okada Y, D'Armiento J, Günther A. Pivotal role of matrix metalloproteinase 13 in extracellular matrix turnover in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 7;19 (2). 2013

117.- Placido L, Romero Y, Maldonado M, Toscano-Marquez F, Ramírez R, Calyeca J, Mora AL, Selman M, Pardo A. Loss of MT1-MMP in Alveolar Epithelial Cells Exacerbates Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 13;22(6):2923. 2021

Anexo

Todos los ratones utilizados en este estudio fueron genotipados por la técnica de PCR para detectar los tres componentes alélicos Tet-O-Cre, Sftpc-RtTA y MMP14FI/FI.

Primers y condiciones para el transgén Tet-O-Cre

| Protocolo Primers Tet-O-Cre | | | | |
|-----------------------------|----|--------------------------------------|----|-------------------------------------|
| Primer | 5' | Sequence 5' --> 3' | 3' | Tipo de primer |
| oIMR1084 | - | GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC | - | Control positivo interno foward |
| oIMR1085 | - | GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT | - | Control positivo interno Reverse |
| oIMR7338 | - | CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT | - | Transgene Forward |
| oIMR7339 | - | GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C | - | Transgene Reverse |

Tet-o-cre Tg (4primer pcr):

Control interno=324bp

Transgén Tet-O-cre=100bp

| | |
|---------------------|--------|
| PCR mix 2x | 10 ul |
| Primer 1 (oIMR1084) | 1 ul |
| Primer 2 (oIMR1085) | 1 ul |
| Primer 3 (oIMR7338) | 1 ul |
| Primer 4 (oIMR7339) | 1 ul |
| DMSO | 0.2 ul |
| Agua | 3.8ul |
| DNA genómico | 2.0 ul |

Preparar el mix de reacción, adherir 2ul de DNA en cada tubo y después el mix de reacción.

| | | |
|--------------|------|-----|
| Paso 1 | 98°C | 30s |
| Paso 2 (30x) | 98°C | 10s |

| | | | |
|------|---|------|-------|
| | | 66°C | 30s |
| | | 72°C | 15s |
| Paso | 3 | 72°C | 5 min |
| Paso | 4 | 4°C | Hold |

Condiciones y primers para el transgen rtTA

| Protocol Primers rtTA | | | | |
|-----------------------|----|--------------------------------|----|----------------------------------|
| Primer | 5' | Sequence 5' --> 3' | 3' | Tipo de primer |
| oIMR8744 | - | CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG | - | Control positivo interno forward |
| oIMR8745 | - | GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT | - | Control positivo interno Reverse |
| oIMR8746 | - | CGC TGT GGG GCA TTT TAC TTT AG | - | Transgene Forward |
| oIMR8747 | - | CAT GTC CAG ATC GAA ATC GTC | - | Transgene Reverse |

rtTA-SPC Tg (4primer pcr):

Control interno=200bp

Transgen rtTA-SPC=450bp

| | |
|---------------------|--------|
| PCR mix 2x | 10 ul |
| Primer 1 (oIMR8744) | 1 ul |
| Primer 2 (oIMR8745) | 1 ul |
| Primer 3 (oIMR8746) | 1 ul |
| Primer 4 (oIMR8747) | 1 ul |
| DMSO | 0.2 ul |
| Agua | 3.8ul |
| gDNA | 2.0 ul |

Preparar el mix de reacción, adherir 2ul de DNA en cada tubo y después el mix de reacción.

| | | |
|--------------|------|-------|
| Paso 1 | 98°C | 30s |
| Paso 2 (30x) | 98°C | 10s |
| | 66°C | 30s |
| | 72°C | 15s |
| Paso 3 | 72°C | 5 min |
| Paso 4 | 4°C | Hold |

MMP14^{F1/F1} (4primer pcr):

Control interno=200bp

Transgen rtTA-SPC=450bp

| | |
|------------------------|--------|
| PCR mix 2x | 10 ul |
| Primer 1 LoxP sense | 1 ul |
| Primer 2 Lox antisense | 1 ul |
| Primer 3 ctrl sense | 1 ul |
| Primer 4ctrl antisense | 1 ul |
| DMSO | 0.2 ul |
| Agua | 3.8ul |
| gDNA | 2.0 ul |

Preparar el mix de reacción, adherir 2ul de DNA en cada tubo y después el mix de reacción.

| | | |
|--------------|------|-------|
| Paso 1 | 98°C | 30s |
| Paso 2 (30x) | 98°C | 10s |
| | 66°C | 30s |
| | 72°C | 15s |
| Paso 3 | 72°C | 5 min |
| Paso 4 | 4°C | Hold |

Protocolo Primers rtTA

| Primer | 5' | Sequence 5' --> 3' | 3' | Tipo de primer |
|-------------------|-----------|----------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| loxP sense | - | ATC AAG TCA TTT TCC CCA CCA C | - | Control positivo interno foward |
| loxP antisense | - | CTG AGC TGT GCA TGG TCT CTT | - | Control positivo interno Reverse |
| Control sense | - | ATC CAG AGG GAA TTC TGC AAA G | - | Transgene Forward |
| Control antisense | - | GAC CTT ATG ACC ACG AAG GCA | - | Transgene Reverse |