



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Caracterización del efecto de la eliminación de
macrófagos pulmonares por clodronato en el
modelo de fibrosis pulmonar inducida por
bleomicina en el ratón (*Mus musculus*) deficiente de
la enzima MMP13”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

PRESENTA:

Daniel Hernández Barrientos

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María Sandra Cabrera Benítez

Ciudad de México, 2019





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.

1. Datos del alumno
Hernández
Barrientos
Daniel
5549060726
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
312071550
2. Datos del tutor
Dra.
María Sandra
Cabrera
Benítez
3. Datos del sinodal 1
Patricia
Rivas
Manzano
4. Datos del sinodal 2
Javier Andrés
Juárez
Díaz
5. Datos del sinodal 3
Marina
Maciel
Herrerías
6. Datos del sinodal 4
Iliana
Herrera
Fuentes
7. Datos del trabajo escrito
Caracterización del efecto de la eliminación de macrófagos pulmonares por
clodronato en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en el ratón
(*Mus musculus*) deficiente de la enzima MMP13
97p
2019

AGRADECIMEINTOS INSTITUCIONALES

A mi casa que me ha dado todo la **Universidad Nacional Autónoma de México**.

A la **Facultad de Ciencias**, UNAM.

Al **Laboratorio de Fibrosis (Biopatología Pulmonar)**, en especial a mi grupo de trabajo que me acogió como mi familia, y al **LANSBioDyT** de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Al **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas**.

Al **Dr. Carlos Lopez Otín** de la Universidad de Oviedo por la donación de los ratones deficientes de la enzima MMP13.

A la **Dra. Annie Pardo**, al **Dr. Moisés Selman**, al **MVZ Alberto Pizaña**, al **Dr. Miguel Gaxiola** y A Remedios Ramírez, Técnico del Laboratorio de Fibrosis de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Agradezco el otorgamiento de beca de **SEP-CONACyT** -235891-26666-2656. Número de registro 26666, número de proyecto 235891.

Agradezco a **Sarai de Jesús Cruz Gómez**, Técnico Asociado C del Laboratorio de Nanobiología Celular, por su ayuda con la captura de fotomicrografías estereoscópicas.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi madre, a quien dedico este trabajo.

“If I have seen further, it is by standing upon the shoulders of giants” (Sir Isaac Newton), “Si he logrado ver más allá, es porque estoy sentado sobre hombros de gigantes”, desde que escuché esta frase hace poco más de un año de una de las personas que más admiro académicamente, ha sido mi forma de observar cada avance, cada logro, cada éxito que ocurre, cada gran paso que doy en mi vida y la vida misma en general.

Para mí esta frase tiene dos concepciones muy bellas, la más común se encuentra dentro del contexto de la ciencia donde surgió, la cual se refiere a que cada pequeño o gran paso que da un investigador o un científico, tiene como antecedente años de esfuerzo y trabajo de quienes lo precedieron. La segunda, que la reflexión que a mí más me gusta, es un poco más cotidiana pero igual o más relevante. Para mí, esos hombros que sostienen firmemente, ese gigante que no me ha dejado caer en cada momento de mi vida, esos años de esfuerzo y trabajo que hacen posible este pequeño avance, pertenecen a la persona más importante de mi vida, **mi madre**.

Gracias a ella es que he podido seguir el camino que he elegido sin voltear atrás, sin preocupaciones ni dificultades, ella se ha encargado de quitar todos los obstáculos frente a mí aun cuando ella tropezaba con los propios. Mi madre no ha quitado su mano de mi espalda, siempre con la suficiente fuerza para impulsarme a continuar adelante pero no la suficiente como para detenerme. Siempre ha estado física y emocionalmente, y aunque representa un reto, también económicamente. No hay palabras para decir lo agradecido que estoy por ser su hijo y espero siempre esté orgullosa de ser mi madre.

A mi tutora.

Si algo que me ha quedado claro gracias a mi experiencia y la de compañeros y amigos como universitarios, y en particular nuestra experiencia dentro del hermoso campo de la investigación científica, es que los tutores son parte fundamental en esta etapa y en la dirección que tomamos una vez la concluimos. Aunque no tengo duda de esto, tampoco me queda la menor duda de que he sido muy afortunado de haber conocido y elegido a una de las mejores tutoras, investigadoras y personas que he conocido.

Gracias a su pasión y habilidad como docente inició en mí el gusto por la investigación. Gracias a su disposición por enseñar me aceptó en su grupo de trabajo cuando apenas comenzaba a tener una idea de mi carrera, gracias a su confianza, logré desenvolverme dentro del mismo y desarrollar habilidades que en otro lugar no me hubiera sido posible. Gracias al gran interés por sus alumnos, nunca me topé con algo que frenara mi carrera. Gracias a su capacidad como investigadora para conseguir presupuesto y amabilidad, conté con apoyos económicos que me permitieron desempeñarme de mejor manera.

Por todo esto quiero agradecerle a **Sandra Cabera Benítez**, por ser parte vital en mi formación como Biólogo y como persona.

A mis amigos.

Agradezco a **Tania Quintero Duarte** y **Samantha Ordoñez Flores** mis amigas, confidentes y familia. De lo mejor que la biología me ha dado y una de las razones por las que se ha convertido en la etapa de mi vida que más he disfrutado. Gracias por sus consejos siempre oportunos, por su apoyo siempre incondicional y por su compañía, que da el toque de felicidad que toda persona necesita en su vida.

Gracias a **Diana Ibarra Aguilar** y **Raquel Cortez García** la familia que yo elegí y que pesar de la distancia siempre las siento cerca. Gracias por compartir mis triunfos y dejarme compartir los suyos.

Gracias a **Ernesto Saúl Gutiérrez López** por su amistad y compañía en la parte más difícil de la carrera.

Gracias a **Mariana Maciel Herrerías** quien además de ser una amiga fue mi guía y mi maestra durante los 3 años de mi estancia en este grupo de trabajo. Quien cuenta con toda mi admiración a pesar de codearse con personas más grandes y experimentadas en el ámbito científico. Agradezco su disposición y paciencia para darme las herramientas necesarias para desenvolverme y su confianza para aplicarlas.

A mis sinodales.

Por la dedicación y esmero que mostraron en este trabajo y que han mostrado siempre como docentes. Por ser una fuente de inspiración para mí y personas a las que guardo gran aprecio.

A Casandra Jiménez Becerra. Mi apoyo, mi ejemplo y mi compañera.

Gracias por caminar a mi lado durante todo este tiempo, por conocer cada detalle, por seguir cada paso, por sentir conmigo cada sentimiento que me ha dado este camino. Gracias por ser mi alegría en los triunfos y mi consuelo en la frustración. Mi oído cuando necesite que alguien me escuchara, mi motivación cuando me faltaba y mi ejemplo desde el primer día.

Gracias por apoyarme en las buenas decisiones y persuadirme en las malas, por creer en mí e impulsarme a alcanzar siempre un objetivo más alto, por festejar mis victorias y acompañarme en las derrotas. Porque sin estar estas más que nadie, porque en ti mis palabras siempre encuentran destino, por ser una persona extraordinaria en todo sentido.

Gracias porque contigo la felicidad apenas si deja tiempo a la tristeza, porque cada proyecto emprendido se disfruta más en equipo, porque mis logros son los tuyos y los tuyos míos. Y gracias porque tantas razones para decir gracias.

Gracias por tanto amor.

INDICE

Resumen	10
Antecedentes.....	11
Introducción.....	17
Fibrosis pulmonar idiopática (FPI).....	17
Matriz extracelular.....	19
La matriz extracelular durante la FPI.....	21
Metaloproteasas de matriz (MMPs).....	23
Colagenasa 3 (MMP13)	24
Deficiencia de MMP13 y su fenotipo en modelos murinos.....	29
MMP13 en fibrosis pulmonar.....	33
Macrófagos y su implicación en la fibrosis pulmonar.....	36
Clodronato como mecanismo de eliminación de macrófagos.....	42
Justificación.....	46
Hipótesis.....	49
Objetivos.....	49
Objetivo general.....	49
Objetivos particulares.....	49
Materiales y Métodos.....	51
Población de estudio.....	51
Modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.....	52
Modelo de eliminación de macrófagos.....	53
Evaluación semicuantitativa del porcentaje de fibrosis.....	54
Purificación de RNA y perfil de expresión de la MMP13.....	54
Cuantificación de hidroxiprolina pulmonar.....	54
Extracción y cuantificación de proteína total.....	55
Ensayo de degradación de colágena tipo I.....	56
Ensayo de actividad de la enzima MMP13.....	56
Inminodetección por ensayos tipo Western blot.....	58
Inmunohistoquímica.....	59
Análisis estadístico.....	59

Resultados.....	60
Expresión de la MMP13 después de la inducción de fibrosis con bleomicina.....	60
Localización celular de la MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar.....	61
Evaluación de la respuesta fibrótica en el ratón deficiente de la enzima MMP13.....	63
Eliminación de macrófagos pulmonares mediante la administración de Clodronato contenido en liposomas.....	65
La eliminación de los macrófagos pulmonares produce un aumento en la respuesta inflamatoria durante la resolución.....	66
Evaluación de la expresión de marcadores de macrófagos para determinar la eficacia de eliminación después de la administración de clodronato.	69
La eliminación de los macrófagos pulmonares, durante la etapa de resolución, favorece la persistencia del daño y fibrosis.....	74
Localización celular de la MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar postadministración de clodronato.....	76
Evaluación de la actividad colagenolítica en el tejido pulmonar.....	78
Discusión.....	79
Papel de la MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar.....	79
Papel de los macrófagos durante la resolución de la fibrosis pulmonar.....	81
Papel de los macrófagos en la repuesta inflamatoria.....	85
Conclusiones.....	89
Referencias.....	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macrófagos M1/M2 y su implicación en la fibrosis.....	12
Figura 2. La eliminación de los macrófagos retarda la resolución de la fibrosis hepática..	14
Figura 3. Los macrófagos son la principal fuente de MMP13 y su deficiencia en ratones <i>mmp13^{-/-}</i> causa un retardo en la resolución de la fibrosis hepática.....	15
Figura 4. La eliminación de los macrófagos retarda la resolución de la fibrosis pulmonar en el modelo de bleomicina.....	16
Figura 5. Patogénesis de la FPI.....	17
Figura 6. Cambios patológicos dentro del intersticio de la matriz extracelular en la FPI..	21
Figura 7. Función pluripotente de la matriz extracelular en la patogénesis de la fibrosis pulmonar.....	22
Figura 8. Dominios estructurales de la MMP13.....	25
Figura 9. Regulación multifactorial de las MMPs.....	26
Figura 10. El papel central de la MMP13 en la cascada de activación de las MMPs.....	28
Figura 11. Mecanismo de activación de las MMPs. Las MMPs son expresadas como proenzimas.....	29
Figura 12. Aumento de la zona hipertrófica en el cartílago epifisiario.....	32
Figura 13. Aumento del hueso trabecular en ratones deficientes de MMP13.....	33
Figura 14. Representación esquemática de las funciones de las MMPs y TIMPs en la fibrosis.....	35
Figura 15. Diferentes fenotipos y funciones de los macrófagos durante la fibrosis.....	38
Figura 16. Mecanismos de acción del clodronato sobre el metabolismo de los macrófagos.....	43
Figura 17. Modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.....	52
Figura 18. Modelo de eliminación de macrófagos.....	53
Figura 20. Principio del <i>kit</i> utilizado para el ensayo de actividad de la enzima MMP13...57	57
Figura 21. Expresión de MMP13 después del daño pulmonar inducido por bleomicina...61	61
Figura 22. Localización celular de MMP13 después del daño pulmonar inducido por bleomicina durante la etapa de resolución de la fibrosis.....	62

Figura 23. La deficiencia de <i>Mmp13</i> sensibiliza a los ratones a la fibrosis pulmonar experimental y retrasa la resolución de la fibrosis.....	63
Figura 24. La deficiencia de <i>Mmp13</i> sensibiliza a los ratones a la fibrosis pulmonar experimental y retrasa la resolución de la fibrosis.....	64
Figura 25. La administración de Clo-lip durante la resolución de la fibrosis pulmonar aumenta la mortalidad.....	66
Figura 26. La eliminación de los macrófagos durante la resolución causa un incremento en la respuesta inflamatoria.....	67
Figura 28. Desarrollo de tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) en ratones tratados con bleomicina y clodronato.....	69
Figura 29. Localización del marcador de macrófagos F4/80 postadministración de Clo-lip en ratones tratados con bleomicina.....	70
Figura 30. Localización celular de marcador de macrófagos alternativamente activados (Ym1), postadministración de Clo-lip en ratones tratados con bleomicina.....	72
Figura 31. Expresión de F4/80 y Ym1 evaluada por <i>immunoblot</i> después de la administración con clodronato en ratones tratados con bleomicina.....	73
Figura 32. Efecto de la eliminación de macrófagos durante la resolución de la fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina.....	75
Figura 33. La administración de Clo-lip reduce los macrófagos MMP13 positivos.....	77
Figura 34. La eliminación de los macrófagos disminuye la actividad colagenolítica durante la resolución de la fibrosis pulmonar.....	78

RESUMEN

La deficiencia de la enzima MMP13 durante el desarrollo de fibrosis pulmonar ha revelado fenotipos contradictorios después de la lesión pulmonar, y su papel durante la resolución de la fibrosis pulmonar aún no está definido. La MMP13 ha sido considerada como la principal colagenasa en roedores, y la remodelación de la colágena fibrilar se atribuye ampliamente a la acción de esta enzima. En esta tesis, el objetivo general fue explorar el papel de la MMP13 durante la progresión y la resolución de la fibrosis pulmonar. La fibrosis pulmonar fue inducida por instilación intratraqueal de bleomicina y las etapas inflamatoria, fibrótica y de resolución, se evaluaron en pulmones de ratones silvestres y deficientes de Mmp13. Se extrajo el lavado bronquioalveolar para el análisis de citocinas y para evaluar la actividad de las gelatinasas. Nuestros resultados mostraron que la MMP13 se sobreexpresa principalmente durante dos etapas después de la lesión pulmonar: durante la inflamación y durante la resolución de la fibrosis, y se expresa principalmente en macrófagos alveolares e intersticiales. Los ratones nulos de Mmp13 experimentaron una fibrosis pulmonar más extensa y prolongada en comparación con los ratones silvestres. La resolución retardada en los ratones deficientes en Mmp13 se caracterizó por una disminución de la actividad colagenolítica global y por la presencia persistente de focos fibróticos asociados con áreas de enfisema. La eliminación de los macrófagos durante la etapa de resolución en los pulmones silvestres imitó el fenotipo observado en los ratones nulos de Mmp13. Estos hallazgos indican que la enzima MMP13 desempeña un papel antifibrótico y que su actividad es crucial en la reparación y la restauración del tejido pulmonar durante la resolución de la fibrosis.

ANTECEDENTES

El estudio de los macrófagos y su implicación en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) no es concepto de reciente investigación, desde finales del siglo pasado se sabe que durante la FPI los macrófagos alveolares presentan una mayor producción de interleucina (IL)-13, un potente estimulador de la proliferación y de la síntesis de matriz extracelular en los fibroblastos (Passalacqua *et al.*, 2017). Además, durante la FPI ocurre la diferenciación de monocitos a macrófagos, lo que sugirió en su momento un posible papel de estas células en la enfermedad. Sin embargo, al igual que el aún creciente campo de investigación de la FPI, un número de publicaciones hasta nuestros días ofrecen nueva evidencia sobre la implicación de los macrófagos en el desarrollo y progresión de la fibrosis pulmonar.

Los macrófagos son células de larga vida, biosintéticamente activas, con potentes funciones endocíticas, fagocíticas y secretoras, capaces de modular sus propiedades mediante el contacto con diferentes tipos celulares, así como con la matriz extracelular. De igual manera, son células muy versátiles en su habilidad para reconocer y responder a una gran variedad de estímulos expresando una variedad de receptores de superficie e intracelulares, múltiples vías y complejos de transducción de señales y distintos arreglos de expresión génica (Gordon *et al.*, 2014). Ejemplo de esto se observa durante el proceso inflamatorio, el cual ocurre en el hospedero posterior a una infección con un agente patógeno, en este, los macrófagos interactúan recíprocamente con otros tipos celulares incluyendo los linfocitos T, los cuales producen citocinas que regulan la función de los macrófagos. En este contexto, la acción de las citocinas producidas por los linfocitos T reguladores (Th1/Th2) sobre los macrófagos, que regulan su activación diferencial, dio lugar al concepto de polarización. Dentro de este concepto los macrófagos pueden ser clásicamente activados por citocinas proinflamatorias producidas por los linfocitos Th1 como interferón gamma (IFN- γ) y adquieren un fenotipo M1 proinflamatorio, o bien son alternativamente activados por citocinas antiinflamatorias derivadas de los linfocitos Th2 como la interleucina-4 (IL-4) adquiriendo un fenotipo M2 antiinflamatorio (Martinez & Gordon, 2014).

A partir del surgimiento del paradigma de los macrófagos clásica y alternativamente activados, estas células adquirieron un mayor interés en el estudio de la FPI (Mouratis & Aidinis, 2011), debido a que los macrófagos M2 parecen estar implicados de manera importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar (Wynn & Vannela, 2016) (**Figura 1**). Los macrófagos M2 presentan una elevada expresión de moléculas como Ym1 y Arginasa 1 considerados marcadores de esta población y al menos la expresión de uno de estos marcadores (Arginasa1) se encuentra elevada en paciente con FPI (Byrne *et al.*, 2016). Sin embargo, en la actualidad el paradigma de los macrófagos M1/M2 está en constante discusión y autores sugieren que estas poblaciones de macrófagos representan los extremos de un espectro de fenotipos que, *in vivo*, pueden estar presentes al mismo tiempo en las poblaciones de macrófagos, y adicionalmente los macrófagos pulmonares son sumamente plásticos y pueden presentar fenotipos de activación transitorios en lugar de estar terminalmente diferenciados (Byrne *et al.*, 2016).

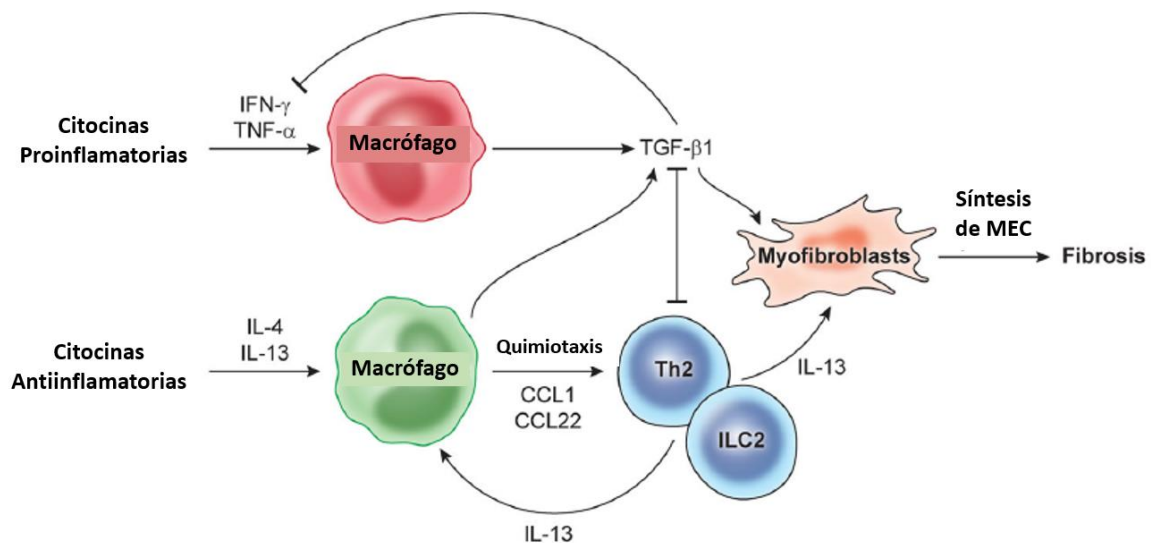


Figura 1. Macrófagos M1/M2 y su implicación en la fibrosis. Los mediadores inflamatorios (como IFN- γ y TNF- α) promueven una activación clásica de los macrófagos o fenotipo M1. El TGF- β 1 también puede ser producido por los macrófagos como un mecanismo de retroalimentación el cual facilita la resolución/atenuación de la respuesta proinflamatoria promoviendo la activación de fibroblastos y su diferenciación hacia miofibroblastos, exacerbando la síntesis y el depósito y promoviendo así la fibrosis pulmonar. La citosina antiinflamatoria IL-13, también funciona como el principal estimulador para la reparación del tejido y la fibrosis induciendo a TGF- β 1 y promoviendo el desarrollo de los macrófagos alternativamente activados. Modificada de Wynn & Vannela, 2016.

La discusión anterior aporta un avance en el entendimiento de la fibrosis pulmonar, sin embargo, replantea la forma de estudiar a estas células en el contexto de la FPI y representa un reto al enfocar dichos estudios. En este contexto, una técnica desarrollada por Van Rooijen & Van Nieuwmegen (1984) denominada “técnica suicida”, proporcionó una valiosa herramienta en el estudio de los macrófagos. Dicha técnica emplea clodronato como mecanismo de eliminación, una molécula capaz de inducir apoptosis en las células; y está basada en la capacidad fagocítica de los macrófagos, los cuales son capaces de ingerir agentes extraños como los liposomas. Así estos investigadores introdujeron clodronato en liposomas que una vez introducidos en ratones por distintas vías son capaces de eliminar selectivamente los macrófagos de distintos tejidos.

Esta técnica fue adaptada posteriormente por Thepen *et al.* (1989), para la eliminación selectiva de los macrófagos alveolares mediante la administración intratraqueal de los liposomas, sin embargo, dicho grupo enfocó el uso de esta técnica en el estudio de la respuesta inmune mediada por macrófagos. No fue hasta el inicio de nuestra década que esta técnica adquirió especial interés en el estudio de la fibrosis pulmonar, aunque anteriormente se utilizó en el estudio de la fibrosis hepática (Duffield *et al.*, 2005; Fallowfield *et al.*, 2007) En este contexto, Murray y colaboradores (2011) fueron los primeros en hacer aportaciones importantes al estudio de la FPI utilizando la técnica de depleción de macrófagos mediante la administración intranasal de clodronato. Este grupo demostró que los macrófagos son células cruciales en la progresión de la fibrosis inducida por TGF- β 1 en un modelo transgénico, debido a que la eliminación de estas células aminora el grado de fibrosis y los niveles de colágeno total en el pulmón. Aunado a esto se observó una reducción de la respuesta a muerte celular inducida por TGF- β 1, por lo que en conjunto estos hallazgos postulan a los macrófagos como una fuente crucial de TGF- β .

En lo que respecta al estudio de la resolución de la fibrosis, poco se ha profundizado en este campo, debido a que la resolución en si es un objeto de crítica al modelo de bleomicina, ya que la FPI es una enfermedad crónico degenerativa e incurable. Sin embargo, hasta la fecha la instilación intratraqueal de este agente antineoplásico es el modelo más popular para el estudio *in vivo* de la fibrosis pulmonar y, como algunos autores lo señalan, entender la fase

de la resolución de la fibrosis pulmonar puede proveer herramientas cruciales y ayudar al desarrollo de nuevas terapias (Glasser *et al.*, 2016). Así los principales trabajos que preceden a este estudio son los mencionados a continuación.

En el 2005 Duffield *et al.* evaluaron la importancia de los macrófagos en la resolución de un modelo de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl_4). En dicho estudio desarrollaron un modelo de eliminación selectiva de macrófagos mediante la generación de un ratón transgénico *CD11b-DTR*, el cual expresa el receptor a la toxina de la difteria asociado al marcador de macrófagos CD11b, una vez introducida la toxina de forma intravenosa se elimina la población de monocitos y macrófagos que característicamente expresan este marcador. Este grupo demostró que, al eliminar selectivamente los macrófagos asociados a cicatrización durante la reparación tisular, se disminuye la degradación de MEC (**Figura 2**), lo que sugiere que los macrófagos asociados a cicatrización promueven la degradación y reabsorción de compuestos de la matriz.

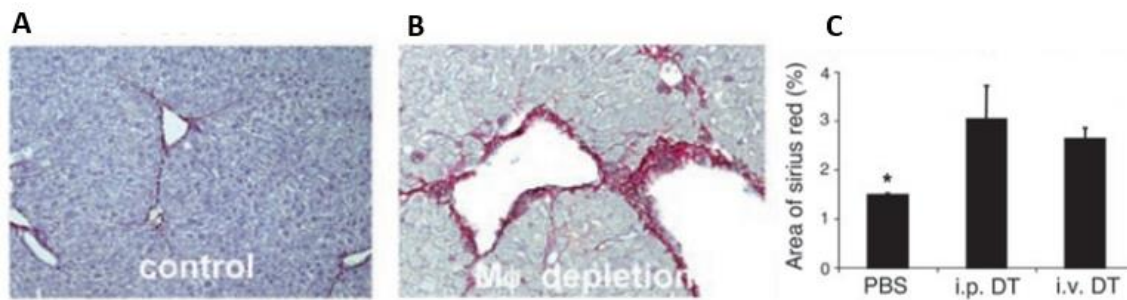


Figura 2. La eliminación de los macrófagos retarda la resolución de la fibrosis hepática. Se observa un aumento en la persistencia de la colágena teñida con rojo sirius en ratones a los que se les eliminó la población de macrófagos (B) con respecto a los tratados únicamente con CCl_4 (A) durante la resolución de la fibrosis, 5 días después de la última administración de CCl_4 . Se observa una persistencia del área teñida con rojo sirius en ratones a los que les eliminó la población de macrófagos (C). Tomada de Duffield *et al.* 2005.

Dichos hallazgos fueron ampliados por el mismo grupo (Fallowfield *et al.*, 2007), mostrando evidencias de la importancia que tienen los macrófagos en la producción de la MMP13, principal colagenasa en ratones encargada de la degradación de colágena fibrilar principalmente las colágenas tipo I y II, y la relación de esta enzima en la resolución de la fibrosis hepática. En este segundo estudio, trabajaron con un modelo murino de cirrosis inducido por la administración de CCl_4 intraperitonealmente por 12 semanas, después de la

cual hay una resolución espontánea de la fibrosis. Observaron que la expresión de *mmp13* presenta un incremento de hasta 70 veces con respecto a los controles durante la resolución de la fibrosis, además, demostraron que los macrófagos son los principales productores de este enzima en esta etapa del modelo (**Figura 3 A**) y que la depleción de estas células mediante el sistema *CD11b-DTR* produce un decremento en la expresión de la enzima y un retraso en la resolución. Finalmente, demostraron que la deficiencia de la MMP13 en ratones *mmp13*^{-/-} provoca un retardo en la resolución de la fibrosis (**Figura 3 B-C**).

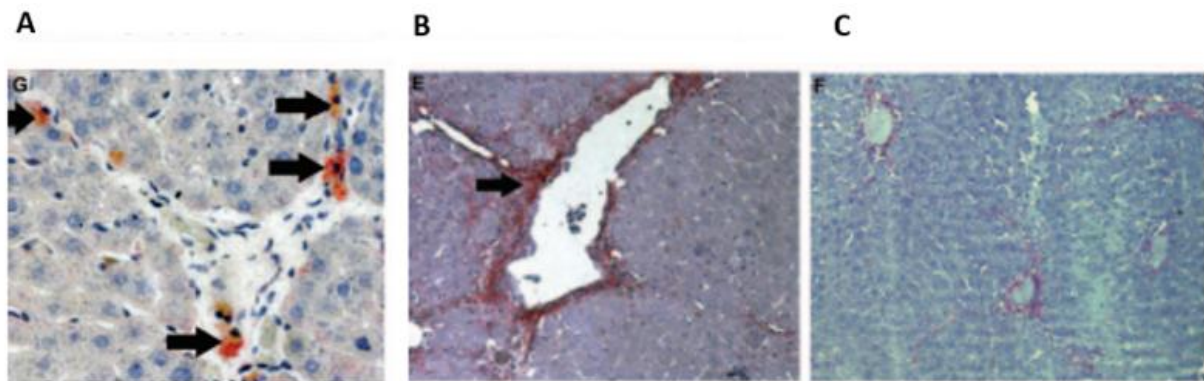


Figura 3. Los macrófagos son la principal fuente de MMP13 y su deficiencia en ratones *mmp13*^{-/-} causa un retardo en la resolución de la fibrosis hepática. La enzima MMP-13 colocaliza con el marcador de macrófagos ED-1 durante la resolución de la fibrosis hepática (A). Por otro lado, la remodelación de la matriz ocurre considerablemente en ratones silvestres durante la resolución de la fibrosis inducida por CCl₄ (C), pero este proceso se ve atenuado en ratones *mmp13*^{-/-} (B). Tomada de Fallowfield *et al.*, 2007.

Posteriormente estos hallazgos se corroboraron y trasladaron parcialmente al modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina por grupos distintos. En 2011 Gibbons y colaboradores demostraron que, al eliminar la población de macrófagos pulmonares durante la resolución de la fibrosis, ya sea por la instilación intratraqueal de clodronato o utilizando el sistema *CD11b-DTR*, se observa un retraso en la resolución de la fibrosis (**Figura 4**), sin profundizar en los posibles mecanismos que subyacen a este fenómeno. Finalmente, Nkyimbeng *et al.* (2013) estudiaron biopsias de pacientes con FPI y evaluaron la expresión de las colagenasas, y de las gelatinasas entre otras MMPs y encontraron un aumento en la expresión de la MMP-13 a nivel de mRNA y proteína, con respecto a pacientes sanos. Además, demostraron que el ratón *mmp13*^{-/-} tratado con bleomicina muestra una respuesta fibrótica aumentada con respecto a los ratones silvestres.

Los estudios anteriores han establecido la importancia de los macrófagos también durante la resolución de la fibrosis pulmonar, pero su relación con la MMP13 en el modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina aún no ha sido completamente dilucidada en estudios anteriores. Por tal motivo, la finalidad de este trabajo fue estudiar la implicación de los macrófagos pulmonares en la producción de la MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar.

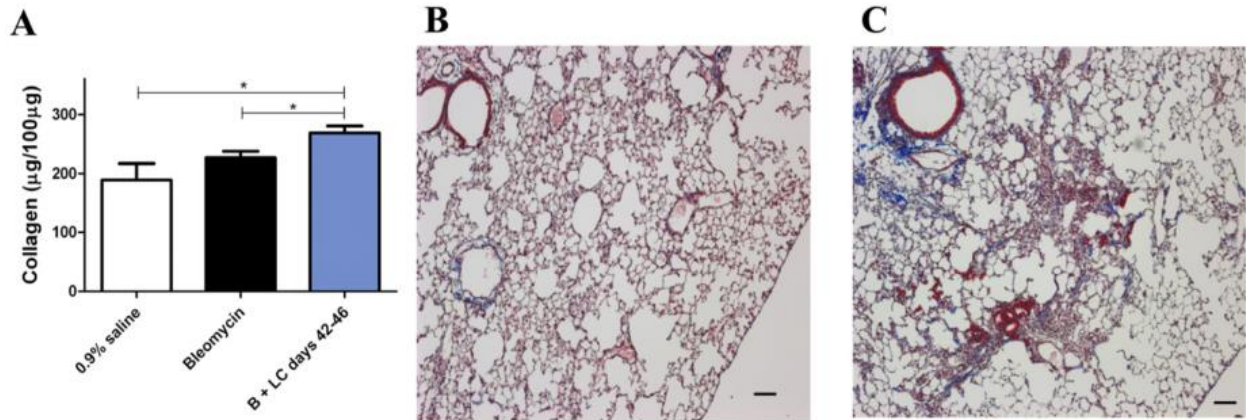


Figura 4. La eliminación de los macrófagos retarda la resolución de la fibrosis pulmonar en el modelo de bleomicina. La depleción de los macrófagos pulmonares retarda la resolución de la fibrosis como se determinó por la cuantificación de colágena (A), y corroborado por tinción tricrómica de Masson (B). Tomada de Gibbons et al., 2011.

INTRODUCCIÓN

Fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad devastadora y punto final común a varios desordenes pulmonares. La FPI representa la enfermedad más común y agresiva de las denominadas enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID); es una enfermedad crónica, progresiva y letal, de etiología desconocida (Selman *et al.*, 2002; Pardo y Selman, 2002; Pardo y Selman, 2006). La FPI se presentan en adultos de mediana edad y adultos mayores (edad media de diagnóstico de 66 años, con un rango de 55-75 años) y la media de supervivencia se encuentra entre los 2.5 y los 3.5 años. La incidencia anual de la FPI se encuentra en aumento y para el 2011 se estimaba que era entre 4.6 y 16.3 por cada 100000 personas y la prevalencia de 13 a 20 casos por cada 100000 y los factores de riesgo más importantes es el tabaquismo y la exposición a metales y material particulado deriva de productos maderables como el aserrín (King *et al.*, 2011).

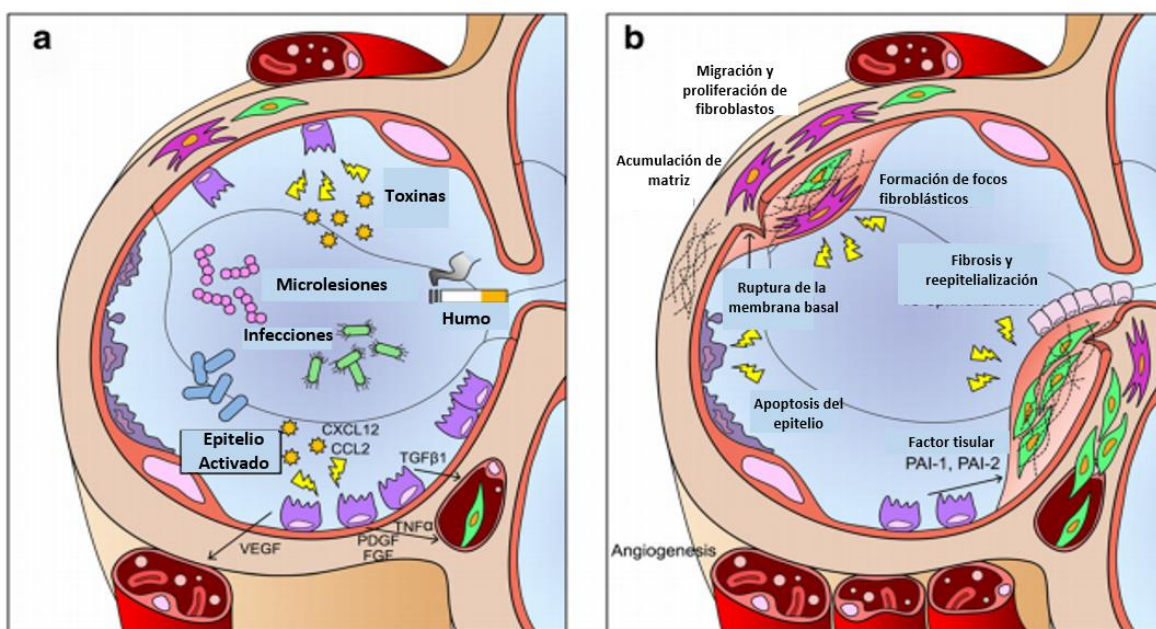


Figura 5. Patogénesis de la FPI. Daños repetidos a lo largo del tiempo desencadenan un proceso de reparación maladaptativo, caracterizado por la apoptosis de las células epiteliales alveolares tipo 2, proliferación y transición epitelio-mesénquima y una subsecuente proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y acumulación de matriz extracelular. Modificada de Sgalla *et al.*, 2018.

Los mecanismos patogénicos de la FPI no son claros, a pesar de la comprensión integral de la FPI la patogénesis sigue siendo difícil de entender. Se ha propuesto que la exposición a diversos agentes ambientales y microbianos es un factor importante en la patobiología de la FPI. Factores individuales genéticos y epigenéticos permanecen como los más importantes para el desarrollo del proceso fibrótico, aunque la contribución de las variantes identificadas hasta ahora, o su interacción con los factores externos putativos aún no se ha aclarado. En un contexto de susceptibilidad genética, las microlesiones repetidas al epitelio alveolar se han reconocido como el primer desencadenante de un proceso de reparación alterado donde diversos tipos celulares pulmonares desarrollan un comportamiento aberrante, lo que lleva al proceso fibrótico (**Figura 5**).

Se postula que la fibrosis evoluciona durante un largo intervalo de tiempo en pacientes con FPI; cuando se diagnostica, la estructura pulmonar se ve modificada de manera importante por la enfermedad, y las características patológicas se caracterizan por diferentes etapas de daño epitelial, hiperplasia de células epiteliales alveolares (AEC)-tipo 2, fibrosis densa y células mesenquimales anormales en proliferación (Sgalla *et al.*, 2018). En los pulmones normales, la pérdida de células epiteliales alveolares tipo 1 (AEC1, Por sus siglas en inglés, *alveolar epithelial cells type 1*) después de una lesión es seguida por la proliferación y diferenciación de AEC2 y células troncales, que restauran la integridad alveolar lo cual involucra varios mecanismos: activación de la cascada de coagulación, angiogénesis, activación y migración de fibroblastos y síntesis de colágeno. Muchas citocinas producidas tanto por las células epiteliales, fibroblastos y miofibroblastos, así como macrófagos entre otros tipos celulares, como el TGF- β 1, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés *platelet derived growth factor*), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés *vascular endothelial growth factor*) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés *fibroblast growth factor*), promueven dicho proceso. Si la lesión persiste, o la capacidad de reparación de daño se ve afectada, el proceso de cicatrización de la herida pasará por una fase inflamatoria, con un aumento en los niveles de interleucina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés *tumor necrosis factor alpha*), creando un entorno bioquímico que conduce a la regeneración crónica y la remodelación de tejido que se traduce en un proceso fibrótico (Sgalla *et al.*, 2018).

Matriz extracelular.

La matriz extracelular (MEC) es una intrincada red compuesta fundamentalmente por agua, proteínas, glucosaminoglicanos y proteoglicanos, organizados de forma tejido específico. Cada tejido posee una MEC con una composición y topología únicas, las cuales son generadas durante el desarrollo a través de interacciones bioquímicas y biofísicas entre varios componentes celulares (p. ej. elementos epiteliales, fibroblastos, endoteliales, adipocitos, etc.), de forma dinámica y recíproca (Frantz *et al.*, 2010).

Esta compleja red desempeña participa en la regulación del desarrollo, función y homeostasis de todas las células eucarióticas. Además de proveer soporte estructural, la MEC participa activamente en el establecimiento, separación y mantenimiento de los tejidos y órganos diferenciados regulando la abundancia de factores de crecimiento y receptores, el nivel de hidratación y el pH del ambiente local (Mouw *et al.*, 2014).

El ‘matrisoma’ del humano, es decir, el conjunto de moléculas que componen la MEC, comprende aproximadamente 300 proteínas, entre las cuales se encuentran dos principales clases macromoléculas: proteínas fibrosas (incluyendo colagenas y elastina) y glicoproteínas (incluyendo fibronectina, proteoglicanos y la laminina) (Mouw *et al.*, 2014); además de moléculas asociadas encargadas de modificar la MEC (p. ej. metaloproteasas de matriz (MMPs) e integrinas) (White, 2015).

En el pulmón humano, la MEC se compone principalmente de colágeno de tipo I y III en una proporción de aproximadamente 2: 1, lo que proporciona resistencia a la tracción; elastina, que proporciona el marco estructural y la elasticidad de la pared alveolar; y laminina y colágeno IV, que constituyen la mayor parte de las membranas basales de los alveolos y de las vías respiratorias (Glasser *et al.*, 2016).

En este órgano, así como en todos los demás, la MEC se encuentra típicamente restringida a dos compartimentos básicos: la membrana basal y el espacio intersticial. La membrana basal es una lámina delgada y especializada de glicoproteínas encontrada por debajo de las capas de células epiteliales y endoteliales, y rodeando el músculo, el tejido adiposo y las fibras nerviosas periféricas que constituyen los plexos pulmonares. Por otro lado, la matriz intersticial forma una malla fibrilar, la cual interconecta los tipos celulares estructurales

dentro del tejido, manteniendo la cohesión tridimensional y las características biomecánicas del pulmón. Además, dentro del intersticio pulmonar, los fibroblastos son las células más comúnmente identificadas y son los principales responsables de la producción de la MEC (White, 2015; Burgstaller *et al.*, 2016).

Las colágenas constituyen la mayor porción del contenido proteico del pulmón, y éstas son severamente alteradas durante procesos de enfermedad. Las colágenas fibrilares (tipos I, II, III, V y XI) las cuales poseen una alta resistencia a la tensión, pero baja elasticidad, contribuyen a la arquitectura general del pulmón, mientras las largas fibras elásticas, caracterizadas por una baja resistencia a la tensión y alta elasticidad, proporcionan al pulmón su recuperación elástica. Éstas últimas están compuestas de dos tipos de moléculas distintas: la elastina, encontrada en su forma entrecruzada en el núcleo interno de las fibras, y las microfibrillas, proteínas encontradas en la periferia externa (Burgstaller *et al.*, 2016).

La matriz intersticial de los alveolos está compuesta por una malla laxa, la cual incluye a las colágenas tipo I y III y la elastina como proteínas centrales importantes. Los proteoglicanos también son un componente principal de la MEC, los cuales consisten en un núcleo proteico unido covalentemente a polisacáridos sulfatados o glucosaminoglucanos. Debido a su alto contenido de polisacáridos los proteoglicanos son hidrofílicos, permitiendo así la formación de un hidrogel y contribuyendo a la viscoelasticidad del pulmón (Burgstaller *et al.*, 2016).

Además de las funciones estructurales que desempeña en el pulmón, la MEC funciona como reservorio de un gran número de factores de crecimiento y citocinas, cruciales para la diferenciación y la proliferación celular. De esta manera, el matrisoma es un compartimento multidimensional dinámico que ejerce 3 funciones fundamentales en el pulmón: provee soporte estructural previniendo el colapso de las vías aéreas superiores, forma una membrana basal especializada en las vías aéreas inferiores, facilitando el intercambio gaseoso y funciona como un reservorio de moléculas como factores de crecimiento celular, que al entrar en contacto con sus receptores en la superficie celular, activan vías de señalización involucradas en diversos procesos como la proliferación (Tomos *et al.*, 2017).

La matriz extracelular durante la FPI.

Las MEC, está en constante reconstrucción y remodelación a través de la síntesis, degradación, reensamblaje y modificación química de sus componentes. Este proceso es complejo y requiere de una regulación estrecha para mantener la homeostasis tisular, especialmente en respuesta a daño (Bonnans *et al.*, 2014). Durante la FPI el balance entre la síntesis y degradación de colágena se encuentra desregulado, lo que conlleva a una excesiva acumulación de MEC (Tomos *et al.*, 2017). La presencia de una lesión sostenida al pulmón y la subsecuente activación de mecanismos de reparación conducen a una destrucción continua del tejido pulmonar parenquimatoso, continuamente reemplazado por tejido cicatricial, el cual comprende grandes y condensados agregados de células y MEC dentro del intersticio pulmonar, conocidos como focos fibroblásticos, dando como resultado una pérdida de la elasticidad del tejido y aumento de la rigidez, un engrosamiento del intersticio pulmonar y la pérdida progresiva de la función de la respiratoria (Burgstaller *et al.*, 2016).

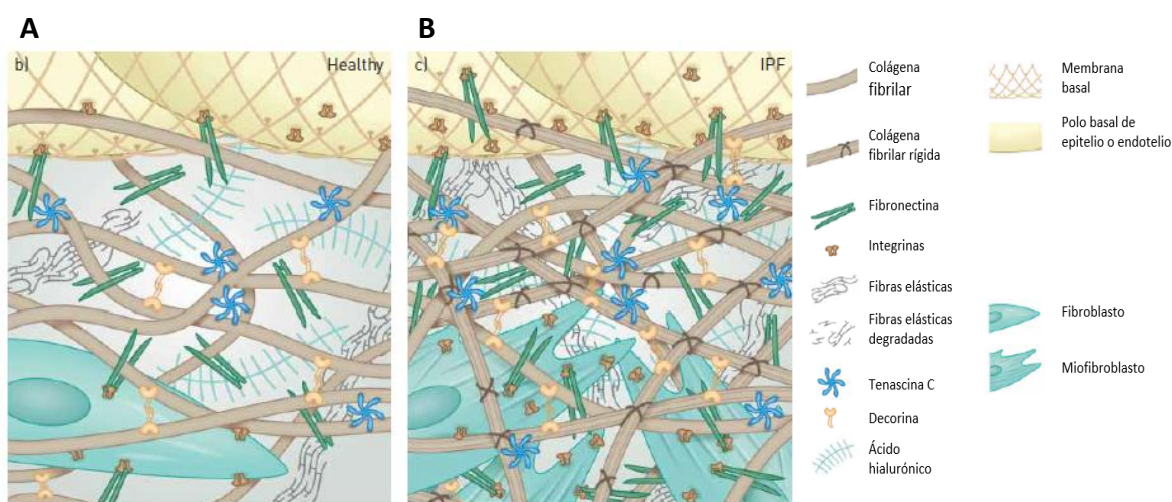


Figura 6. Cambios patológicos dentro del intersticio de la matriz extracelular en la FPI. En la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos altamente contráctiles, los cuales depositan grandes cantidades de moléculas de la MEC en el intersticio e incrementan dramáticamente la rigidez de la MEC mediante la producción de lisil oxidasa, encargada del entrecruzamiento enzimático covalente de la colágena y la elastina. Comparación del microambiente de un pulmón sano (A) con el de un pulmón con FPI (B). Modificada de Burgstaller *et al.*, 2016.

Los focos fibroblásticos contienen fibroblastos activados que se diferencian a miofibroblastos altamente contráctiles debido a la estimulación por factores de crecimiento

profibróticos como el factor de crecimiento transformante (TGF- β , por sus siglas en inglés *transforming growth factor*), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF, por sus siglas en inglés *connective tissue growth factor*), y factor de necrosis tumoral (TNF- α , por sus siglas en inglés *tumor necrosis factor alfa*). Estos miofibroblastos, son resistentes a la apoptosis y presentan un fenotipo secretorio senescente característico de la FPI, además, son responsables de depositar grandes cantidades de moléculas de la MEC en el intersticio y con ello favorecer el incremento de su rigidez mediante el entrecruzamiento enzimático covalente de la colágena y elastina, a través de la acción de los miembros de la familia LOX (lisil oxidasa) (Burgstaller *et al.*, 2016) (**Figura 6**).

A su vez, los componentes de la MEC también juegan un papel importante y multifactorial en la progresión de la FPI (**Figura 7**). Por un lado, el aumento de la rigidez de la matriz, debido a la acción de proteínas como LOX y fibronectina (proteína multimérica fibrilar que fortalece y estabiliza la MEC), promueve la activación, diferenciación y resistencia a la apoptosis de los fibroblastos. Por otro lado, la MEC actúa como mediador en el proceso inflamatorio, a través de moléculas como el ácido hialurónico (HA) y la elastina, las cuales contribuyen directamente en la regulación de la actividad quimiotáctica, la función fagocítica, la afinidad de adhesión y la respuesta inmune de las células polimorfonucleares (Tomos *et al.*, 2017).

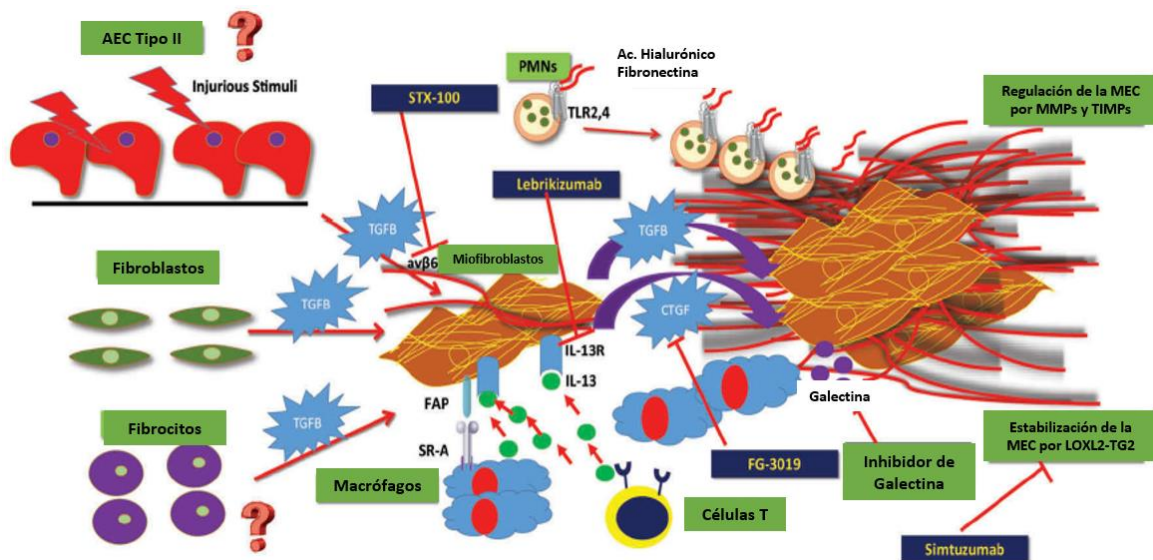


Figura 7. Función pluripotente de la matriz extracelular en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Los componentes de la MEC ejercen un rol profibrótico pluripotente que regula el comportamiento celular a través de los siguientes mecanismos: (1) Activación del TGF- β por los receptores transmembranales denominados integrinas, (2) Interacción con los receptores tipo Toll (TLRs) en la superficie de las células polimorfonucleares (PMNs) promoviendo su migración y adhesión a la MEC y subsecuente activación, (3) Facilitando la interacción entre células inmunes (macrófagos y células T) y fibroblastos a través de la proteína de activación de fibroblastos (FAP), galectina-3 e IL-13, permitiendo la activación de los fibroblastos, diferenciación a miofibroblastos y producción excesiva de MEC. Modificada de Tomos *et al.*, 2017.

Metaloproteasas de matriz (MMPs).

La modulación de las interacciones célula-MEC ocurre a través de la acción de un sistema proteolítico único, responsable de la hidrólisis de una variedad de componentes de la MEC. El recambio y remodelación de la MEC debe ser fuertemente regulado, ya que una proteólisis no controlada contribuye al desarrollo anormal del organismo y a la generación de una diversidad de condiciones patológicas caracterizadas por una degradación excesiva de los componentes de la MEC (Chakraborti *et al.*, 2003).

Las metaloproteasas de matriz (MMPs), son el principal grupo de enzimas que regulan la composición célula-matriz. Las MMPs son endopeptidasas dependientes de zinc conocidas por su habilidad para cortar uno o más constituyentes de la MEC, así como otras proteínas no pertenecientes a la matriz como citocinas. Comprenden una amplia familia de enzimas extracelulares de las que se han clonado 25 tipos diferentes en vertebrados hasta la fecha. Específicamente forman una subfamilia de la superfamilia de proteasas de metzincina (denominada así por la presencia de un ion de zinc y un residuo de metionina conservados en el sitio activo) la cual constituye una de varias familias de metaloendopeptidasas (Stamenkovic, 2003).

Las MMPs de todos los mamíferos comparten una estructura de dominios conservado la cual consiste de un dominio catalítico y un prodominio autoinhibidor (Page-McCaw *et al.*, 2007). El dominio catalítico es de aproximadamente 100 aminoácidos y contiene la maquinaria catalítica, incluido el sitio de unión al zinc y la metionina conservada. Este dominio contiene adicionalmente un ion de zinc y de calcio los cuales mantiene la estructura tridimensional de las MMPs y son necesarios para la estabilidad y la acción enzimática (Page-McCaw *et al.*, 2007).

Por otro lado, el prodominio se encuentra río arriba del dominio catalítico y es de aproximadamente 80 aminoácidos. La mayoría de las MMPs se expresan como zimógenos (enzimas inactivas), donde el prodominio N terminal adopta una estructura globular que interactúa con el dominio catalítico y bloquea el sitio activo. En el estado inactivo de la enzima, la cisteína conservada de este prodominio provee un sitio de coordinación para el ion de zinc catalítico e inhibe la catálisis. Por tal motivo, la activación de la enzima requiere de la desestabilización o corte del prodominio, ya sea por autólisis o por acción de otra enzima (Galea *et al.*, 2013).

Todas las MMPs, exceptuando las MMP7, 23 y 26, presentan un dominio tipo hemopexina en el extremo C-terminal (CTD o dominio PEX) de aproximadamente 195 aminoácidos, unido al dominio catalítico a través de una región conectora de 70 aminoácidos. Algunos de estos dominios se han visto implicados en el reconocimiento del sustrato y confieren a la enzima especificidad por el mismo, especialmente en la subfamilia de las colagenasas, en donde la capacidad de cortar la triple hélice de colágeno se asocia a la unión covalente al dominio tipo hemopexina (Bode & Maskos, 2003).

En adición a estos dominios conservados, las MMPs poseen una gran variedad de dominios especializados que contribuyen a la especificidad por su sustrato y al reconocimiento o interacción con otras proteínas o moléculas (Parks & Shapiro, 2000).

Colagenasa 3 (MMP13).

La MMP13 (colagenasa 3), es el tercer miembro de la subfamilia de las colagenasas en ser identificado, y posee propiedades distintas en comparación a la MMP1 (colagenasa intersticial) y la MMP8 (colagenasa de neutrófilos). La MMP13 se clonó por primera vez a partir de una biblioteca de cDNA de cáncer de mama (Freije *et al.* 1994). La hibridación fluorescente *in situ* mapeó el gen de la MMP13 en el cromosoma 11q22-23. Este es un *locus* genético en el que también se localizan varias MMPs (MMP1, MMP7, MMP8, MMP3, MMP10, MMP12 y MMP20), lo que sugiere una ancestría evolutiva común para los genes de las MMPs localizadas en el cromosoma 11q (Leeman *et al.*, 2002).

La transcripción del gen MMP13 genera un mRNA de 2.7 kb que codifica un polipéptido de 471 aminoácidos y una proteína de 60kDa. La MMP13 presenta todos los dominios característicos de las MMPs (**Figura 8**), compartiendo más del 50% de identidad con las demás colagenasas, así como varios residuos específicos de esta subfamilia (Tyr 214, Asp 235, Gly 237). La estructura de su dominio tipo hemopexina en el extremo C-terminal tiene una forma de disco. Este dominio ayuda a la actividad de la triple helicasa, ya que una vez unido el sustrato al dominio catalítico, el dominio tipo hemopexina se pliega sobre este, atrapando el sustrato en el sitio activo (Leeman *et al.*, 2002).

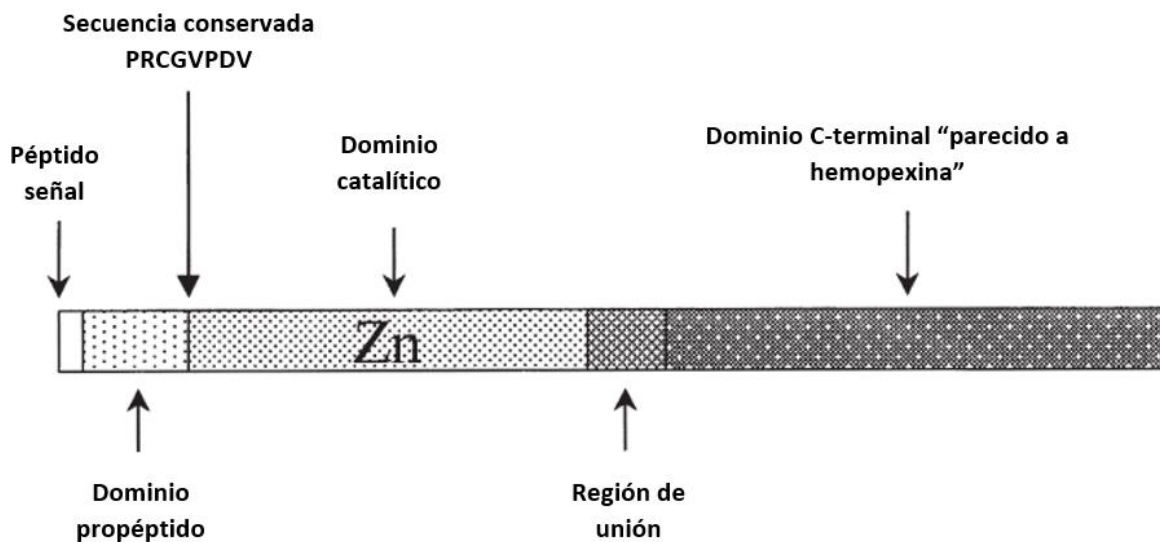


Figura 8. Dominios estructurales de la MMP13. Esta enzima es sintetizada como un precursor inactivo y es activada mediante el corte del propeptido N-terminal. Modificada de Leeman *et al.*, 2002.

Regulación de la expresión génica de la MMP13.

Las características genéticas y de regulación de la MMP13 son típicas del riguroso mecanismo de control asociado a las MMPs (**Figura 9**). Debido al potencial de su actividad y al amplio número de sustratos que procesa esta enzima, su expresión fisiológica está limitada a casos que requieren una rápida remodelación de la MEC (Leeman *et al.*, 2002).

En la biología del hueso, tejido en el cual se encuentra mayormente expresada, la MMP13 desempeña una función vital. Entre los sustratos que degrada esta enzima, se encuentran las

colágenas tipo I, II, III y X las cuales son componentes esenciales de este tejido. Así la MMP13 es expresada por los condrocitos hipertróficos y los osteoblastos durante la embriogénesis, en donde participa en la formación de la placa de crecimiento óseo y en los centros primarios de osificación y, en un estado adulto, durante la osificación endocondral que se da en el proceso de reparación del hueso después de una fractura. En este contexto, el factor de transcripción Cbfa1 (por sus siglas en inglés *core binding factor 1*) así como los factores de crecimiento denominados proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs, por sus siglas en inglés *bone morphogenetic protein*), son importantes en la formación ósea y su regulación, incrementando o disminuyendo la expresión de la MMP13 respectivamente (Leeman *et al.*, 2002).

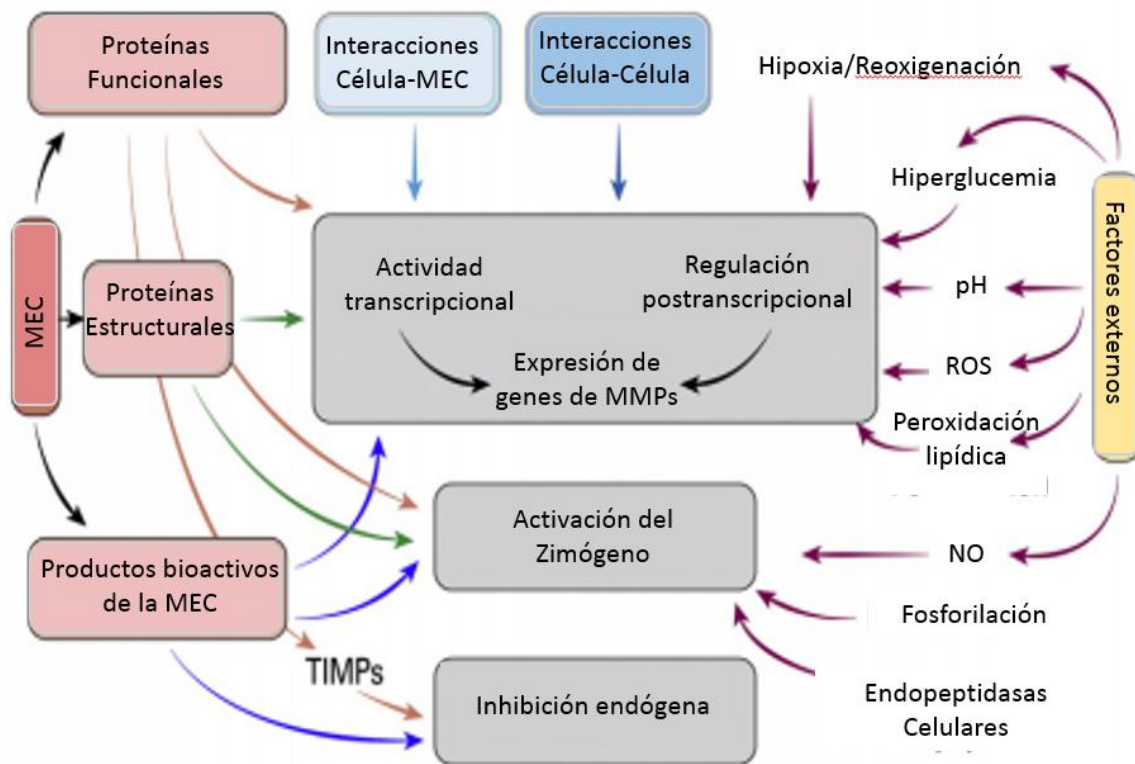


Figura 9. Regulación multifactorial de las MMPs. Las MMPs se regulan a distintos niveles: nivel de expresión génica, activación del zimógeno e inhibición endógena. Modificada de Gaffney *et al.*, 2015.

En condiciones patológicas, la expresión de la MMP13 ha sido objeto de muchos estudios relacionados a distintos tipos de cáncer, mientras que su estudio en fibrosis resulta escaso.

En cáncer se ha visto que esta enzima es fundamental en la progresión de dicha enfermedad y por lo tanto su expresión se ve incrementada, misma situación que se observa en otras enfermedades relacionadas al tejido óseo, como la osteoartritis (Leeman *et al.*, 2002).

Citocinas y factores de crecimiento que regulan a la MMP13.

Entre las moléculas que promueven la expresión de la MMP13, las citocinas interleucina (IL) -1 y -6, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) son las principales inductoras y, de entre ellas, la IL-1 parece ser la citocina de mayor relevancia. En cáncer de mama, la MMP13 es expresada por las células estromales adyacentes a las células tumorales, y principalmente inducida por IL-1 α e IL-1 β (Leeman *et al.*, 2002).

Los factores de crecimiento también participan en la regulación génica de esta enzima, ya sea como inductores o represores de su expresión. Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I y -II) inhiben la síntesis de MMP13, actuando como represores autocrinos. En cambio, el PDGF y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, por sus siglas en inglés *basic fibroblast growth factor*) promueven la transcripción de MMP13 mediante la estimulación de la unión al sitio AP-1 de cFos, FosB, Fra-2, c-Jun y JunB. (Leeman *et al.*, 2002).

TGF- β 1 provee un excelente ejemplo de cómo tanto el ambiente celular y el tipo celular influyen la producción de MMP13. TGF- β 1 acelera la degradación del mRNA de esta colagenasa (la vida media disminuye de 6.25 a 2 horas) y también disminuye el nivel de RNA nuclear y la expresión del gen de la MMP13 en osteoblastos. Por otro lado, TGF β 1 induce fuertemente la expresión de MMP13 en la línea celular de fibroblastos humanos KMST (Leeman *et al.*, 2002).

Activación e inhibición de la MMP13.

La mayoría de las células sintetizan e inmediatamente secretan las MMPs hacia la MEC. Una vez que las MMPs son secretadas como enzimas latentes, la activación fisiológica se convierte en un punto de control crítico. La MMP13 se produce como una proenzima

inactiva, y la activación mediante el corte del prodominio N-terminal puede llevarse a cabo por varias moléculas (**Figura 11**). Entre otros, la plasmina, el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y el activador de plasminógeno tisular (tPA) están implicados como importantes activadores fisiológicos de las MMPs, entre ellas la MMP13 (Tardif *et al.*, 2004).

La presencia de uPA unido a receptores celulares de superficie provee un mecanismo para que la célula active una serie de proteasas que se encuentran en estrecha proximidad a la superficie celular, con el potencial de restringir dicha activación a solo una porción de la superficie (Chakraborti *et al.*, 2003).

In vivo, la MMP14 (MT1-MMP) y MMP2 (gelatinasa A) son las enzimas responsables de la activación de la proMMP13, mediante el corte característico en la unión Glu84-Tyr85, produciendo la forma completamente activa de 48kDa. Al igual que el sistema activador plasmina/plaminogeno, la gelatinasa A puede ser controlada por activadores de receptor asociados a la superficie celular. Este sistema permite a las células la activación de la gelatinasa A cercana o unida a la membrana celular. Además, la MMP2 puede ser activada por las MMPs de membrana (MT-MMPs) 2 y 3, y no solo la 1. A su vez, la MMP14 puede ser responsable de la activación de la proMMP-13, ya sea de forma directa o vía activación de la MMP2 (**Figura 10**).

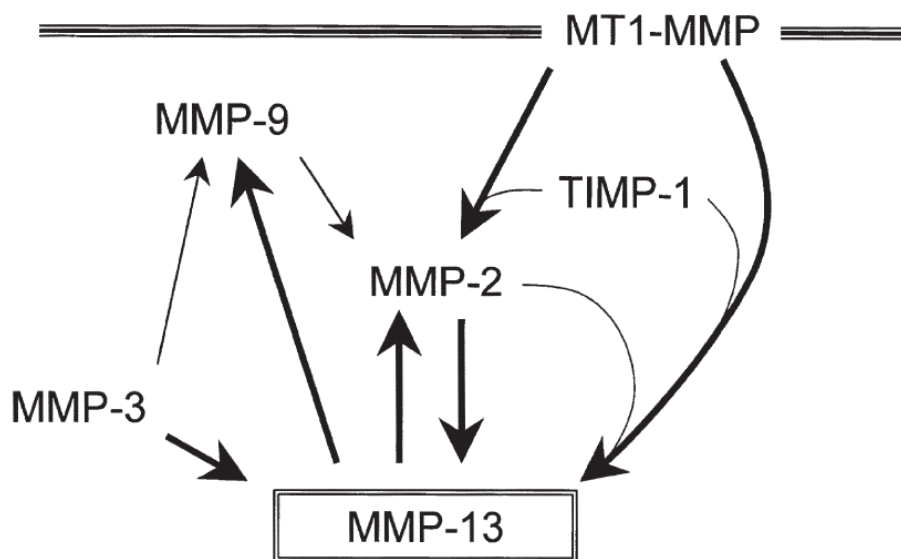


Figura 10. El papel central de la MMP-13 en la cascada de activación de las MMPs. La MMP-13 es activada por la MT1-MMP, la MMP-2, y la MMP-3; la MMP-2 y -9 son activadas por la MMP-13. Tomada de Leeman *et al.*, 2002.

Otras enzimas, como la MMP3 (estromelisin 1) y la principal isoenzima del tripsinogeno humano asociado a tumores, tripsina2, así como la MMP10 (estromelisin 2) y la MMP15 (MT2-MMP) pueden también activar a la MMP13 (Tardif *et al.*, 2004).

La actividad de la MMP13 es controlada fisiológicamente por varios tipos de inhibidores como los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) y las α_2 -macroglobulinas. Todas las formas activas de MMPs son inhibidas por los TIMPs. Éstos forman complejos con las MMPs e interactúan con el sitio activo y un sitio en la región CTD. En el caso particular de la MMP13, ésta es inhibida de manera estequiométrica 1:1 por los 4 tipos de TIMPs. Por otro lado, las α_2 -macroglobulinas son proteínas grandes (750kDa) producidas por el hígado y encontradas en el suero y en líquido sinovial. Estas proteínas actúan como inhibidores no específicos atrapando a las enzimas y, aunque no inhiben su actividad catalítica *per se* bloquean su acceso al sustrato (Leeman *et al.*, 2002).

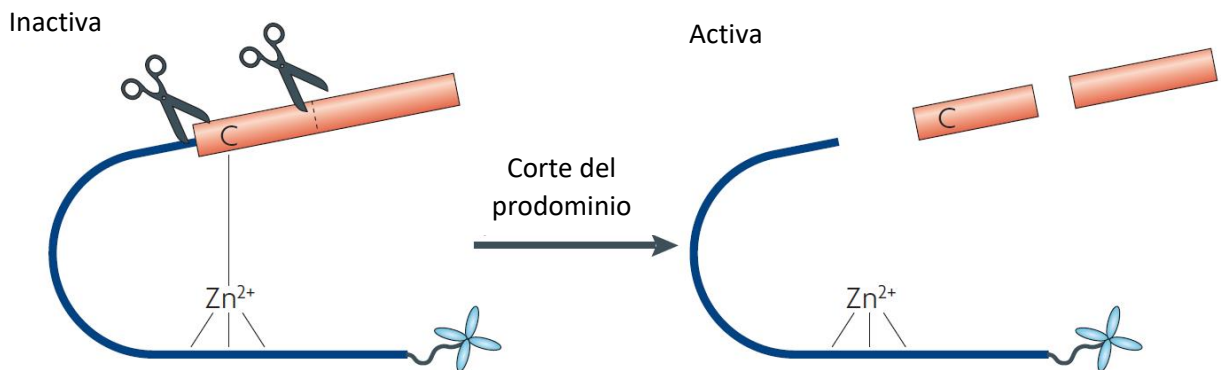


Figura 11. Mecanismo de activación de las MMPs. Las MMPs son expresadas como proenzimas. El prodominio es removido por una combinación de cortes en el dominio mismo y en la unión de este dominio con el dominio catalítico. Modificada de Page-McCaw *et al.*, 2007.

Deficiencia de MMP13 y su fenotipo en modelos murinos.

Entre las MMPs, la MMP13 es de gran importancia en la biología del tejido conectivo óseo y cartilaginoso particularmente durante el desarrollo embrionario en las placas de

crecimiento cartilaginosa y en los centros primarios de osificación (Inada *et al.*, 2004). El cartílago está formado principalmente por células denominadas condrocitos y grandes cantidades de MEC, la cual está compuesta por proteoglicanos, agreganos y colágenos, principalmente del tipo II. Las colágenos del tipo II son extremadamente resistentes a la degradación por la mayoría de las proteinasas debido a su estructura de triple hélice. Solo las MMPs de la familia de las colagenasas incluyendo la MMP1, MMP8 y MMP13, son capaces de degradar las colágenos fibrilares tipo II y desnaturalizarlas en gelatina, la cual puede ser subsecuentemente digerida en péptidos pequeños por las gelatinasas. Debido a la digestión preferencial de la colágena tipo II sobre otras colagenasas, la MMP13 es considerada la colagenasa más importante en la degradación del cartílago, en donde es producida por condrocitos, células sinoviales y osteoblastos (Liang *et al.*, 2016)

Durante la embriogénesis, el desarrollo del tejido óseo ocurre mediante dos mecanismos distintos: la osificación intramembranosa y la endocondral. La distinción entre estos dos procesos radica en si el hueso se forma a partir de un precursor cartilaginosa (osificación endocondral) o si este se forma por un proceso más simple sin la intervención de un precursor cartilaginosa (osificación intramembranosa), sin embargo, estos nombres solo hacen alusión al mecanismo inicial por el cual se forman los distintos huesos. La osificación intramembranosa resulta de la diferenciación de los precursores mesenquimales en osteoblastos, y está restringida a las clavículas y los huesos del cráneo. La osificación endocondral también comienza con la proliferación y acumulación de las células mesenquimales en el sitio donde se desarrollará el futuro hueso, sin embargo, estas células mesenquimales expresan inicialmente colágeno tipo II y se diferencian en condroblastos que, a su vez, producen matriz cartilaginosa (Ross & Pawlina, 2006). Cada paso de la osificación endocondral está acompañado por cambios en la estructura y composición de las moléculas de la MEC producidas por los condrocitos circundantes, la cual finalmente será calcificada por la acción de la fosfatasa alcalina y posteriormente será degradada y servirá como almacén para la síntesis de tejido óseo por los osteoblastos durante la formación de hueso endocondral (Stickens *et al.*, 2004)

Debido a la expresión de la MMP13 por las células que componen el tejido óseo en formación durante el desarrollo embrionario (condrocitos hipertróficos y osteoblastos) y su

capacidad preferencial para procesar colágenas del tipo II, en la década pasada se hipotetizó que esta enzima podría desempeñar un papel importante en la embriogénesis del hueso. Además, apoyando dicha hipótesis se sabe que mutaciones en esta enzima causa la variante de Missouri de la displasia espondiloepifisaria (SEMD), un síndrome con anomalías en el desarrollo y crecimiento de los elementos esqueléticos endocondrales, los cuales se corrigen espontáneamente durante la adolescencia (Kennedy et al., 2003). Por tal motivo, y con el fin de estudiar su función en este proceso diferentes autores han generado ratones deficientes de esta enzima mediante distintos métodos (Inada *et al.*, 2004; Stickens *et al.*, 2004).

Los ratones Knockout *Mmp13*^{-/-} generados mediante recombinación homóloga exhiben una esperanza de vida normal y son fértiles, sin anomalías fenotípicas graves, sin embargo, estos ratones han mostrado tener grandes defectos en la placa de crecimiento ósea. Durante la osificación endocondral postnatal, en el cartílago epifisario se pueden reconocer zonas bien definidas de capas condrocíticas: zona de cartílago de reserva, zona de proliferación, zona de hipertrofia, zona de calcificación de cartílago y zona de resorción (Ross & Pawlina, 2006). En los ratones *Mmp13*^{-/-} se observa un incremento significativo en las zonas de hipertrofia, que no es debida a un proceso de proliferación aberrante, sino que es debida a un retraso en la muerte de los condrocitos hipertróficos, lo que da como resultado un retraso en la osificación endocondral (**Figura 12**). La ausencia de MMP13 en estos ratones resulta en una acumulación significativa de colágena intersticial debido, en parte, a la ausencia de un procesamiento adecuado por las colagenasas lo cual ocurre normalmente en las placas de crecimiento y en los centros de osificación primarios. La severidad de dicho fenotipo incrementa hasta las 5 semanas y se resuelve completamente alrededor de las 12 semanas de edad.

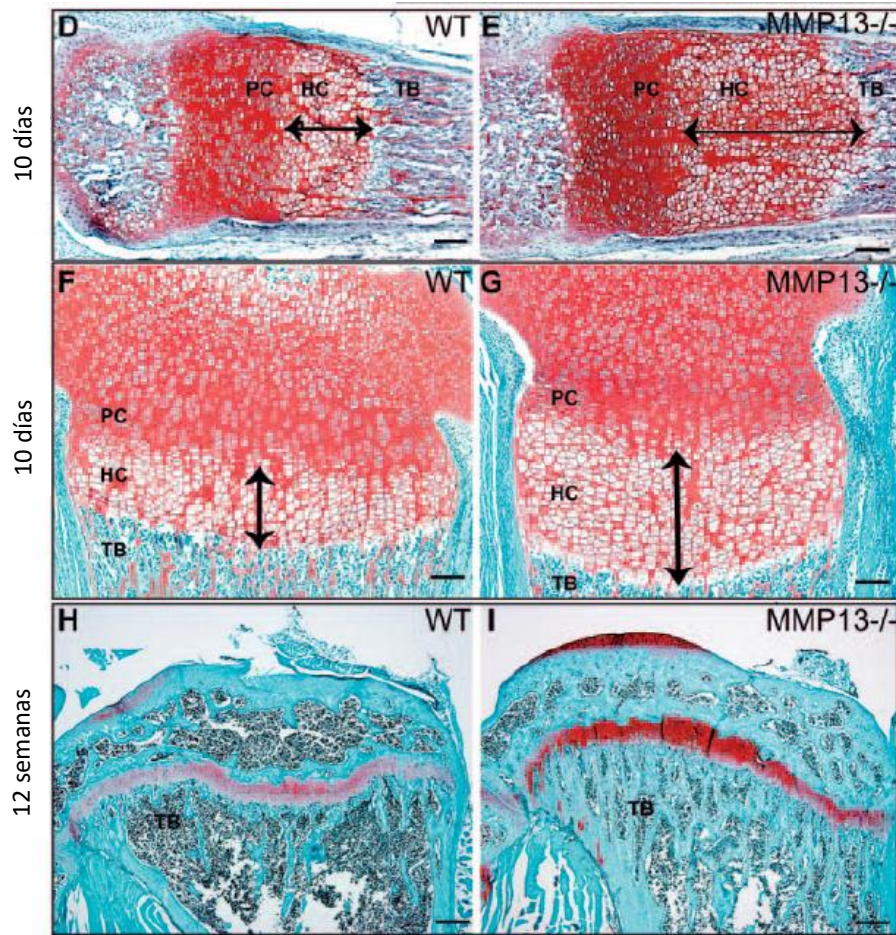


Figura 12. Aumento de la zona hipertrófica en el cartilago epifisario. Su muestra un aumento de la zona hipertrófica de los condrocitos en los ratones *Mmp13*^{-/-} (Paneles izquierdos) con respecto al WT (paneles derechos) (D-I). Y el efecto se mantiene hasta las 12 semanas después del nacimiento (H-I). Modificado de Stickens *et al.*, 2004.

Por otro lado, los ratones *Mmp13*^{-/-} también presentan un incremento en el hueso trabecular y un arreglo irregular de las trabéculas, fenotipo que persiste por varios meses después del nacimiento (**Figura 13**). La formación del hueso trabecular involucra la modelación y remodelación de la matriz ósea, y estos resultados demuestran que la MMP13 está involucrada en dichos procesos. Los defectos en la placa de crecimiento del raton deficiente de MMP13 se traducen una reducción tanto en la rigidez como en la resistencia a la fractura de sus huesos, pero en última instancia, los ratones no muestran anomalías notables en el desarrollo de huesos largos (Inada *et al.*, 2004; Stickens *et al.*, 2004).

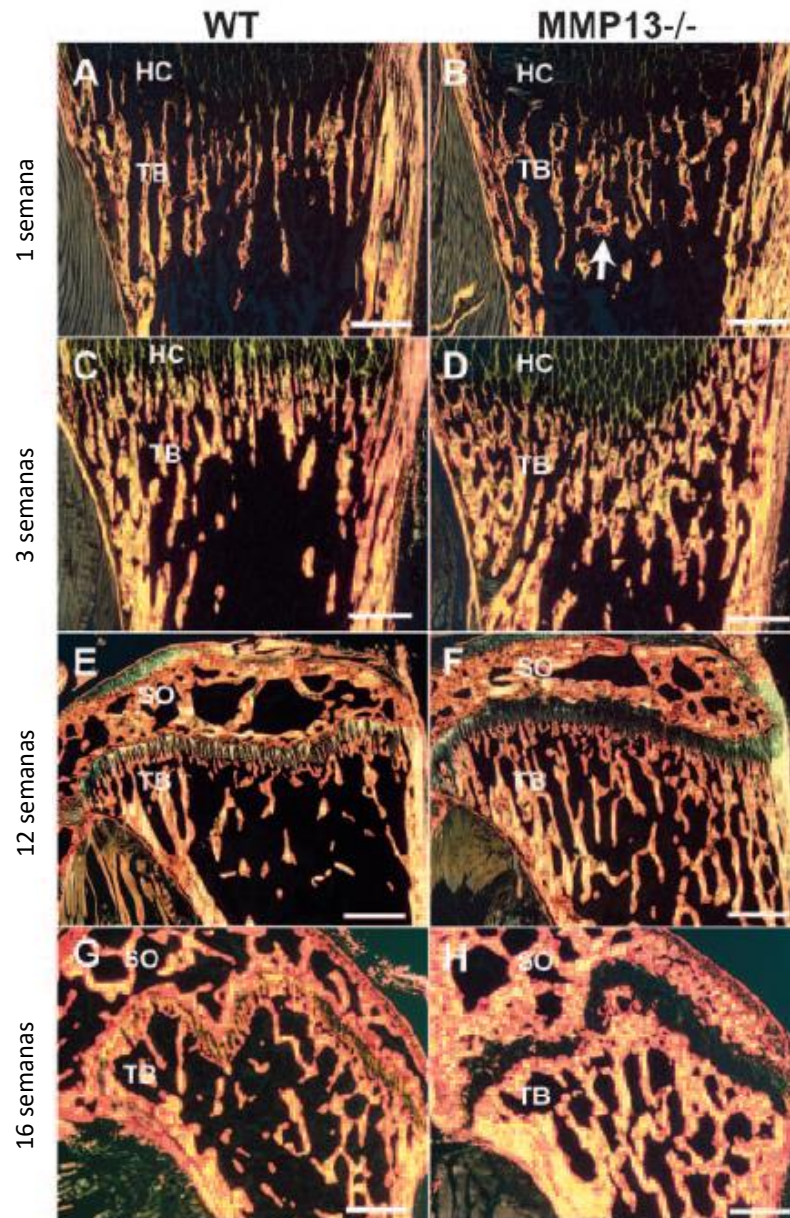


Figura 13. Aumento del hueso trabecular en ratones deficientes de MMP13. Su muestra un aumento del hueso trabecular en los ratones *Mmp13*^{-/-} (Paneles izquierdos) con respecto al WT (paneles derechos) (A-H). Y el efecto se muestra hasta las 16 semanas después del nacimiento (G-H). Modificado de Stickens *et al.*, 2004.

MMP13 en fibrosis pulmonar.

En el contexto de la FPI, las MMPs, se han pensado como componentes antifibróticos, sin embargo, en la actualidad se sabe que mientras enzimas como la MMP19 en efecto juegan un papel antifibrótico, otras como la MMP7, MMP9 y MMP3 tienen un papel profibrótico

en esta enfermedad. Su función como mediadores pro o antifibroticos no es del todo comprendido, pero su papel en la fibrosis pulmonar se ha determinado mediante su eliminación en modelos transgénicos en conjunto con modelos de inducción de fibrosis como la administración de bleomicina (Pardo *et al.*, 2016) (**Figura 14**).

El caso particular de la MMP13 es poco estudiado. Los estudios que se han realizado para evaluar el efecto de esta enzima sobre la respuesta fibrótica en el pulmón ofrecen resultados muy diversos en algunos casos contradictorios. Por ejemplo, Flechsig y colegas reportaron que posterior al daño pulmonar por irradiación, los ratones *Mmp13*^{-/-} presentaban un menor desarrollo de fibrosis que los ratones silvestres, además de presentar una disminución en la inflamación temprana (días después de la irradiación) y también durante la fase fibrogénica (5-6 meses post irradiación). Dichos parámetros se evaluaron mediante pruebas histológicas, observando un menor engrosamiento en los septos alveolares y de la remodelación de la arquitectura pulmonar mediante tomografía volumétrica digital e imágenes de resonancia magnética (Flechsig *et al.*, 2010).

Por otro lado, Sen *et al.* (2010) utilizando un modelo de lesión por hiperoxia, informaron que la extensión de la fibrosis no difirió entre los ratones *Mmp13*^{-/-} y silvestres. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el estudio de Flechsig y colegas, encontraron que la inflamación estaba elevada en ratones *Mmp13*^{-/-} comparados con los ratones silvestres (Sen *et al.*, 2010). En concordancia con el estudio de Sen *et al.* (2010), Nkyimbeng *et al.* (2013) en un estudio de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, observaron una inflamación exacerbada y una respuesta fibrótica aumentada en los ratones *Mmp13*^{-/-} con respecto a los silvestres, la primera atribuible a una respuesta progresivamente incrementada de los neutrófilos. Además, en dicho estudio Nkyimbeng y colegas observaron una sobreexpresión de las colagenasas MMP1 y MMP13 en biopsias de pacientes con FPI a nivel de proteína y mRNA, y localizaron la proteína MMP13 en células epiteliales alveolares y bronquiales, macrófagos alveolares, septos alveolares e intersticio del tejido pulmonar remodelado (Nkyimbeng *et al.* (2013).

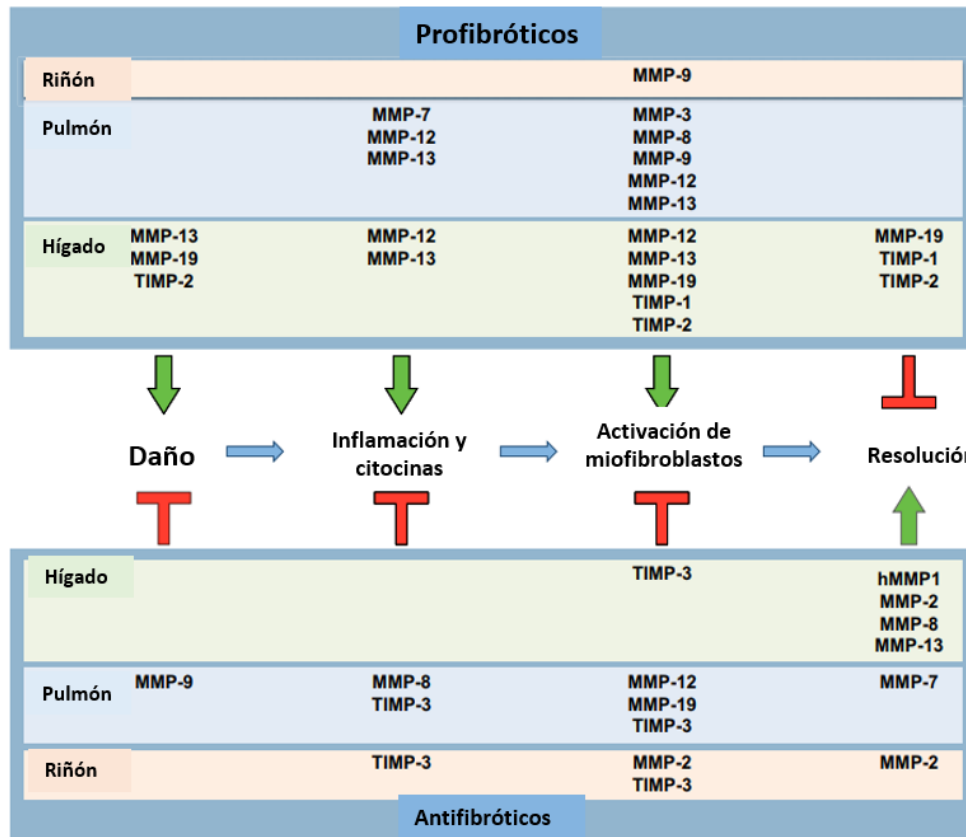


Figura 14. Representación esquemática de las funciones de las MMPs y TIMPs en la fibrosis. Modificada de Giannandrea & Parks, 2014.

Otros estudios demuestran que la MMP13 procesa proteolíticamente quimiocinas específicas (como CCL7 y CXCL12) y esto conduce a una actividad quimiotáctica reducida de macrófagos y monocitos y linfocitos respectivamente lo que tendría un efecto en la respuesta inflamatoria (McQuibban et al., 2001; McQuibban et al., 2002). Dicho efecto se ha evaluado *in vivo* en modelos murinos de edema inducido por la inyección con carragenina, en donde el volumen del edema disminuye cuando las quimiocinas son procesadas por las MMPs entre ellas la MMP13. Debido a que una disminución temprana en la quimiotaxis de células inflamatorias y por lo tanto de su infiltración en el tejido da como resultado una respuesta inflamatoria disminuida, la MMP13 podría estar jugando un rol antiinflamatorio en patologías como la FPI, lo que correlaciona con lo observado por Nkyimbeng *et al.* (2013). La regulación de la quimiotaxis de los leucocitos, macrófagos y monocitos mediante la modificación de la quimiocina mediada por MMPs podría ser un factor importante que contribuya a la gravedad de la enfermedad (Giannandrea & Parks, 2014).

En otros modelos, como el de fibrosis hepática, Fallowfield y colaboradores observaron que la MMP13 juega un papel importante en la resolución de la fibrosis en un modelo de daño por CCL₄, (tetracloruro de carbono) siendo los macrófagos asociados a la cicatrización (SAMs) las principales células productoras de esta enzima. En ratones deficientes *Mmp13*^{-/-}, este grupo observó un retraso en la resolución de la fibrosis, corroborando el papel de esta enzima en el recambio de la MEC y asociando su rol antifibrotico al papel fundamental de los macrófagos en dicho proceso (Fallowfiel *et al.*, 2007).

Macrófagos y su implicación en la fibrosis pulmonar.

Los macrófagos son células fagocíticas mononucleares diferenciadas a partir de monocitos inmaduros y, se originan una vez que los monocitos salen de la circulación para diferenciarse en los diferentes tejidos o bien, se diferencian durante la embriogénesis y permanecen como macrófagos residentes de cada tejido. Aquí tal vez faltaría mencionar que otros vienen desde origen embrionario y que son macrófagos residentes de tejido, como lo pones en los párrafos de abajo. Los macrófagos son células notablemente versátiles en su capacidad para reconocer y responder a una amplia gama de estímulos, expresando una variedad de receptores superficiales e intracelulares, activando múltiples vías de transducción de señales y presentando arreglos complejos y adaptables de expresión génica. Son células biosintéticamente activas de una vida media larga con potentes funciones endocíticas, fagocíticas y secretoras, capaces de modular sus propiedades al contacto con diferentes tipos de células, así como con la MEC (Gordon *et al.*, 2014).

Los macrófagos reciben su nombre de acuerdo al tejido en el que se encuentran: macrófagos intestinales (estómago), células de Kupffer (hígado), células de la microglia (cerebro) y osteoclastos (hueso). En el pulmón, las poblaciones de macrófagos muestran una sorprendente variación, estas células se encuentran en los alvéolos, intersticio, vías aéreas y en la pleura y son frecuentemente clasificados en dos poblaciones, las cuales pueden ser identificadas por su combinación única de marcadores de expresión de superficie: macrófagos alveolares (AMs, por sus siglas en inglés *alveolar macrophages*) localizados estratégicamente en las vías aéreas y cuyo inmunofenotipo es distinto en

ratones (MerTK+ CD68+ Siglec F+ CD11blo CD11c+ CD64+ CD200R++ CD206++) y humanos (CD68+ CD11blo HLA_DR++ CD206++ CD169+ CD11c++ CD206++), y macrófagos intersticiales (IMs, por sus siglas en inglés *interstitial macrophages*), localizados dentro del parenquima pulmonar y su inmunofenotipo también es distinto entre las dos especies, ratones (MerTK+ CD11b+ CD11clo CD64hi MHC II+ CD24_ CD206+) y humanos (CD68+ CD11b+ HLA_DR++ CD206+ CD169_ CD11clo CD206+) (Byrne *et al.*, 2016).

Los AMs residentes se originan del saco vitelino durante la embriogénesis y son células de larga vida las cuales se autorenewan durante la homeostasis (Sieweke & Allen, 2013). Adicionalmente, los AMs se originan postnatalmente a partir de los monocitos circulantes reclutados vía CCL2/CCR2, sin embargo, el principal mecanismo por el cual se da la repoblación de los macrófagos alveolares en el pulmón, tanto en condiciones de homeostasis como después de su eliminación farmacológica es por proliferación *in situ* más que por el remplazamiento por células de médula ósea (Byrne *et al.*, 2016). Los IMs se derivan tanto de los macrófagos del saco vitelino como de los monocitos derivado de médula ósea, y pueden ser reemplazados por los monocitos circulantes tanto en condiciones homeostáticas como en distintas patologías (Byrne *et al.*, 2016; Zhou & Moore, 2018), además, autores sugieren que subpoblaciones de este tipo de macrófagos también poseen capacidad de autorenovación (Schyns *et al.*, 2018). Al mostrar fenotipos y funciones únicas, estas subpoblaciones de macrófagos pulmonares trabajan juntas para mantener la homeostasis en el pulmón, sin embargo, se ha observado que su función como células inmunes en el reconocimiento de patógenos y la producción de citocinas proinflamatorias se reduce con la edad (Boe *et al.*, 2017).

Un cuerpo de evidencia creciente apoya la participación tanto de los AMs como el de los IMs en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Los AMs en particular están involucrados en el procesamiento de la MEC a través de la secreción de las MMPs o mediante la fagocitosis directa de la colágena. Por otro lado, con respecto a los IMs hay una escasez de datos experimentales concernientes a su papel en la fibrosis pulmonar, sin embargo, se sabe que durante la fibrosis pulmonar en modelos murinos, estos adquieren un fenotipo profibrotico

caracterizado por una elevada expresión de CD206, marcador de macrófagos M2 considerados profibróticos (Byrne *et al.*, 2016).

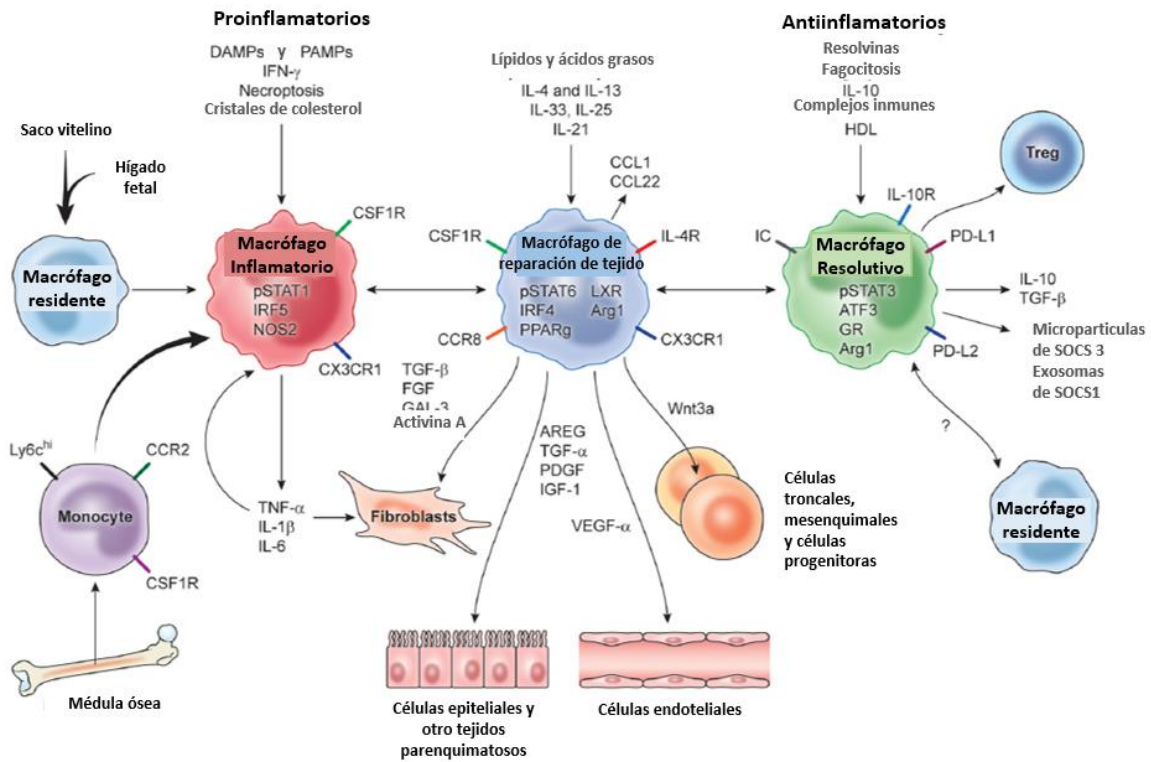


Figura 15. Diferentes fenotipos y funciones de los macrófagos durante la fibrosis. Mecanismos que desencadenan los principales fenotipos de los macrófagos en la fibrosis, reparación y regeneración del tejido. Tomada de Wynn & Vannella, 2016.

En general los macrófagos exhiben una actividad regulatoria crítica en todos los estadios de la fibrosis pulmonar (**Figura 15**), y con frecuencia se encuentra en estrecha proximidad a los miofibroblastos productores de colágena, y pueden secretar una gran variedad de mediadores profibróticos solubles, quimiocinas, y MMPs. Se ha demostrado que los macrófagos juegan un papel importante en la inflamación en un modelo de fibrosis inducida por IL-13, ya que la eliminación en el pulmón tanto de los monocitos como de los macrófagos disminuye la inflamación y la fibrosis (Borthwick *et al.*, 2015). Además, se identificó a los macrófagos residentes de tejido como una fuente importante de quimiocinas que reclutan linfocitos Th2 como la CCL1 y la CCL22 (Borthwick *et al.*, 2015). Así en adición a la producción de mediadores fibróticos como el TGF- β), los monocitos y los macrófagos regulan la respuesta inflamatoria mediante la producción de quimiocinas y

citocinas proinflamatorias (Wynn & Vannella, 2016). Sin embargo, los macrófagos también juegan un papel como células antiinflamatorias, por ejemplo, se observó que una subpoblación de AMs sésiles protege al tejido pulmonar contra el daño generado por la inflamación posterior a la administración de LPS mediante la comunicación directa con las células epiteliales vecinas, enviando señales inmunosupresoras a través uniones GAP (Westphalen *et al.*, 2014).

Durante el proceso fibrótico, la producción de diversos factores por los macrófagos (como el TGF- β) favorece el reclutamiento de fibroblastos para su diferenciación a miofibroblastos, así como su activación y supervivencia mediante la estimulación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB, por sus siglas en inglés *nuclear factor kappa b*), estimulan la proliferación y expansión de las células vecinas para reparar el daño mediante la producción de distintos factores de crecimiento (como PDGF, VEGF, FGF) y suprimen la respuesta inflamatoria mediante la producción de IL-10 y TGF- β 1 (Wynn & Vannella, 2016). Durante la respuesta normal a reparación de daño, los macrófagos adquieren fácilmente un fenotipo que promueve la fibrogénesis (Wynn & Vannella, 2016).

Diversos marcadores, elevados en macrófagos de pacientes con FPI o en modelos de fibrosis pulmonar como el de bleomicina y el de silicosis, se estudian con el fin de entender su implicación en la patogénesis de la enfermedad. En la Tabla 1 se muestran en resumen los marcadores sobreexpresadas por macrófagos durante la FPI o en los modelos experimentales de fibrosis pulmonar, las cuales tienen una función importante en la enfermedad (Byrne *et al.*, 2016).

Tabla 1. Marcadores de macrófagos sobreexpresados durante la FPI (revisado en Byrne *et al.*, 2016).

Marcador	Abreviación	Condición de su estudio	Efecto en la FPI (modelos murinos)
Arginasa 1	Arg 1	Expresión elevada en el modelo de fibrosis inducido por bleomicina y en AMs de pacientes con FPI.	Principal marcador de macrófagos M2 y encargada de la hidrólisis de la arginina a ornitina, una molécula precursora requerida para la síntesis de colágena.
Proteína encontrada en la zona inflamatoria 1	Fizz 1	Ratones deficientes de Fizz1 exhiben una disminución de la fibrosis pulmonar después del tratamiento con bleomicina.	Marcador de macrófagos M2. Participa en la activación de los fibroblastos y en el reclutamiento de células derivadas de médula ósea.
Proteína inflamatoria de macrófagos 4	CCL8	Los niveles de esta proteína se encuentran elevados en el BALF de pacientes con enfermedad fibrótica pulmonar.	Marcador de macrófagos M2. Desencadena la producción de colágena por los fibroblastos.
Quitinasa 1 tipo 3	Ym1	Proteína elevada en el BALF de pacientes con FPI, asociada a una menor supervivencia. Ratones deficientes de Ym1 presentan una disminución de la fibrosis desencadenada por citocinas Th-2.	Marcador de macrófagos M2. Reduce la respuesta inflamatoria. Presenta un rol profibrótico caracterizados por la activación de macrófagos M2, proliferación de fibroblastos y agregación de matriz.
Factor de crecimiento transformante β	TGF- β	Niveles elevados de esta proteína en BALF de pacientes con FPI. Sobreexpresión en modelos murinos resulta en fibrosis pulmonar progresiva.	Citocina inductora de fibrosis más prominente capaz de inducir directamente una variedad de respuestas asociadas a la remodelación incluyendo la deposición de MEC, la activación de fibroblastos, la diferenciación de fibrocitos a monocitos y la respuesta a muerte celular.
Factor de necrosis tumoral α	TNF- α	Datos obtenidos de estudios en modelos murinos sugieren que este marcador tiene un rol protector durante la fibrosis inducida por diferentes métodos.	Su rol aún no está bien definido, ya que se ha visto juega roles opuestos durante la fibrosis.
Interleucina 1 β	IL-1 β	Citocina elevada en AMs de pacientes con FPI. Su sobreexpresión en ratones recapitula varias de las características del modelo de fibrosis inducido por bleomicina.	Participa en la inducción de la fibrosis.

Además de su papel en la producción de mediadores inflamatorios y fibróticos, los macrófagos son una fuente importante de MMPs y pueden influir en el recambio de la matriz tanto de forma directa mediante la producción de MMPs como indirectamente mediante la secreción de citocinas, incluidas IL-1 y TNF- α que modulan la producción de MMPs por otros tipos de células. Dichos mecanismos están involucrados en la resolución de la fibrosis y previamente se estudiaron en diferentes modelos de fibrosis hepática principalmente. Por otro lado, la producción de MMPs por los macrófagos también pueden tener una función antagónica en el proceso de resolución, mediante la represión de la actividad de otras MMPs. Por ejemplo, la MMP12 es una elastasa secretada por macrófagos y su expresión es inducida durante el desarrollo de la fibrosis en un modelo inducido por IL-13. Ratones *Mmp12*^{-/-} muestran una reducción en la fibrosis pulmonar en respuesta a patógenos como *S. mansoni*, asociada a un incremento de la expresión de MMPs como MMP2, MMP9 y MMP13. Estos resultados sugieren que los macrófagos podrían estar promoviendo la fibrosis pulmonar a través de la producción de la MMP12 inducida por IL-13, que a su vez reduce la actividad de MMPs que degradan la MEC (Madala *et al.*, 2010).

En el contexto de la resolución de la fibrosis pulmonar, la implicación de los macrófagos es un área que se ha explorado poco, sin embargo, estudios demuestran que los macrófagos también participan en la resolución de la fibrosis observada en diferentes modelos de fibrosis pulmonar. En particular, uno de estos estudios demostró que al eliminar los macrófagos utilizando clodronato durante la etapa de resolución de la fibrosis en el modelo de bleomicina, hay un retraso en la resolución y una persistencia de los focos fibróticos en el tejido pulmonar (Gibbons *et al.*, 2011), sin embargo, los mecanismos por los cuales los macrófagos participan en este proceso no fueron explorados.

Por otro lado, otro estudio demostró que los macrófagos pulmonares juegan un rol importante en la captación de la colágena fibrilar para su subsecuente degradación mediante una proteína conocida como lactaderina o Mfge8. La lactaderina es una glucoproteína de adhesión que funciona como mediador en la unión y captación de fragmentos de colágena en los macrófagos. En ratones deficientes de Mfge8 se ha observado mayor contenido total de hidroxiprolina pulmonar 28 días después de la lesión con bleomicina con respecto a los

controles, y aunado a esto, los macrófagos deficientes de esta proteína presentan una absorción de colágeno defectuosa (Atabai et al., 2009).

Clodronato como mecanismo de eliminación de macrófagos.

Es ampliamente aceptado que muchas de las principales enfermedades de nuestra sociedad actual, incluyendo la arterioesclerosis, la obesidad, la diabetes y el cáncer están asociadas a la inflamación crónica. De igual manera es ampliamente aceptado que los macrófagos son los principales actores celulares en la inflamación, tanto en su iniciación como en la resolución de la misma, a través de su actividad fagocítica, la liberación de citocinas proinflamatorias, liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación del sistema inmune adquirido. Además de su papel central en el sistema inmune innato, encargado de defender al organismo contra diversos agentes patógenos, los monocitos y los macrófagos tienen una función biológica fundamental en el desarrollo, la cicatrización y la homeostasis tisular (Gordon *et al.*, 2014; Gordon y Martinez, 2017). Por lo tanto, no es de sorprender que estas células hayan ganado un enorme interés durante los últimos años.

Una de las limitantes en la investigación de la biología de los macrófagos utilizando modelos murinos, son las principales diferencias entre los macrófagos de este grupo y los humanos, como lo es la poca frecuencia con la que estos últimos expresan marcadores como arginasa, F4/80 y Ms4a8a. A pesar de dichas limitantes, las vías de señalización centrales, así como los perfiles de factores de transcripción son congruentes entre estos dos grupos y justifican por lo tanto los experimentos en modelos murinos. Por tal motivo, se desarrollaron técnicas para su eliminación en diferentes tejidos utilizando distintos compuestos como la sílica, los asbestos, la carragenina y más recientemente en la década de los 80's el clodronato.

El clodronato (diclorometilenbisfosfanato o Cl₂MBP) es una molécula perteneciente a la familia de los bisfosfonatos, análogos sintéticos del pirofosfato, y dentro de esta es uno de los que mejor se conoce (Frediani y Bertoldi, 2015). La estructura central de estos compuestos difiere ligeramente de su análogo natural, en el hecho de que estos poseen un carbono central no hidrolizable al que se unen dos grupos fosfatos y dos cadenas variables

(R¹-R²), que dan identidad al compuesto (-Cl en el caso del clodronato) (Lehenkari *et al.*, 2002; Drake *et al.*, 2008). Los bisfosfonatos son ampliamente empleados en el tratamiento de enfermedades óseas. Sin embargo, desde el siglo pasado se convirtieron en moléculas de gran relevancia en la investigación. El clodronato en particular, es una herramienta valiosa en la investigación del papel de los macrófagos en diferentes tejidos, bajo condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

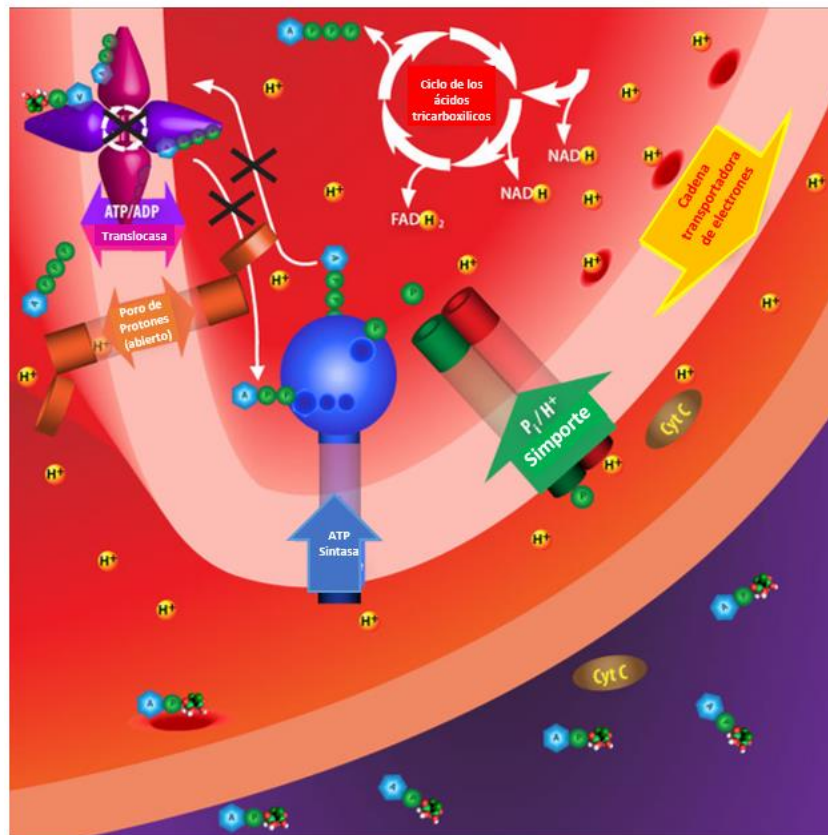


Figura 16. Mecanismos de acción del clodronato sobre el metabolismo de los macrófagos. La inhibición irreversible de la ADP/ATP translocasa interrumpe la cadena transportadora de electrones debido a la despolarización de la membrana interna. Algunos componentes de la cadena transportadora de electrones, como el citocromo C, migran hacia el citosol e inician la apoptosis. Tomada de <https://www.clodrosome.com/other-info/mechanism-of-depletion/>

En este contexto, van Rooijen y colaboradores (1989) desarrollaron una metodología para la eliminación de estas células mieloides, denominada “técnica suicida”, basada en la capacidad de los macrófagos de fagocitar varios tipos de compuestos en forma de partículas

como los liposomas. El clodronato, atrapado en estas vesículas de doble membrana, es introducido al organismo por diferentes vías y al ser ingerido por los macrófagos es liberado hacia el citoplasma provocando la disrupción de su metabolismo y en última instancia induciendo la muerte de las células (Buiting y Rooijen, 1994). Se desconoce el mecanismo de acción de este compuesto, sin embargo, se sabe que en condiciones *in vitro* puede ser metabolizado por las células a un análogo citotóxico del ATP (AppCCl₂p), el cual inhibe la respiración mitocondrial mediante su acción sobre la ADP/ATP translocasa como inhibidor competitivo y sus efectos en la desregulación del potencial de acción mitocondrial (Lehenkari et al., 2002) (**Figura 16**).

Distintos autores demuestran la efectividad del clodronato para eliminar los macrófagos residentes del pulmón, específicamente macrófagos alveolares, administrando los liposomas vía intratraqueal en solución (Thepen *et al.*, 1989) o vía inhalatoria utilizando aerosoles (Elder *et al.*, 2004), sin dañar otros tipos celulares, aunque autores como Duffield *et al.* (2005), señalan limitantes a esta técnica, como la eliminación de otras células inmunes o toxicidad del clodronato para la células del tejido. Bajo este supuesto, se ha estudiado el papel que desempeñan estas células en distintos modelos de asma (Zasłona *et al.*, 2014; Machiels *et al.*, 2017) y lesión pulmonar (Bem et al, 2008).

Un número creciente estudios cuya finalidad es evaluar el papel de los macrófagos en la fibrosis pulmonar, utilizan distintos enfoques y técnicas de eliminación selectiva, tanto de macrófagos como de monocitos, en modelos murinos de fibrosis pulmonar inducida (Moore et al., 2001; Gibbons et al., 2011; Wynn and Vannella, 2016). Particularmente, el clodronato ha sido empleado como una poderosa herramienta en el estudio de la fibrosis pulmonar, Ya que algunos estudios demuestran que este compuesto elimina efectivamente los macrófagos pulmonares en modelos de fibrosis pulmonar como el de bleomicina, y de esta forma es posible evaluar la función de estas células en esta patología. En este contexto, Murray y colaboradores (2011), mediante la eliminación de los macrófagos administrando clodronato intranasalmente en ratones, demostraron que los macrófagos son cruciales en el desarrollo de fibrosis inducida por sobreexpresión de TGF- β , y son una fuente importante de este mediador fibrótico. En el mismo año Gibbons y colaboradores, utilizando el mismo modelo de eliminación de macrófagos, pero administrando el clodronato

intratraquealmente, demostraron que los macrófagos son fundamentales tanto en la progresión de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina como en la resolución, ya que su eliminación reduce el grado de fibrosis y retrasa la resolución respectivamente. Este y otros autores, observaron que el clodronato elimina la población de macrófagos significativamente después de 24 horas y el efecto se mantiene entre 3 y 5 días posteriores a la administración, después del cual la población de macrófagos se recupera (Bem *et al.*, 2008; Gibbons *et al.*, 2011).

La utilidad de esta técnica también se ha demostrado en modelos murinos de lesión pulmonar inducida por Fas, en donde la eliminación de macrófagos pulmonares por clodronato no demostró efectos significativos en el grado de inflamación y por lo tanto se descartó un papel importante de los macrófagos en la regulación de dicho proceso (Bem *et al.*, 2008) En conjunto estos estudios ofrecen evidencia de la importancia del clodronato como herramienta en el estudio de la biología de los macrófagos en enfermedades pulmonares, particularmente en la fibrosis pulmonar.

JUSTIFICACIÓN

La FPI es objeto de gran interés en el ámbito científico y un área de investigación en constante crecimiento, dentro de la cual participan un gran número de científicos y médicos especialistas, con el objetivo de lograr avances en el entendimiento de los mecanismos que subyacen al origen y progresión de la enfermedad, los actores moleculares y celulares que participan en dicho proceso, así como en el desarrollo y mejoramiento de técnicas de diagnóstico y tratamiento eficaces que aminoren la necesidad de recurrir al trasplante pulmonar como única forma de aumentar la supervivencia de los pacientes con FPI. Sin embargo, a pesar de dichos esfuerzos, la FPI continúa siendo una enfermedad letal cuya supervivencia no supera los 5 años de vida una vez que es diagnosticada y sin tratamiento efectivo que detenga la progresión hacia la muerte, debido en parte a un desconocimiento de la etiología y al poco conocimiento de la historia natural y los mecanismos patogénicos.

La pirfenidona y el nintedanib son hasta hoy los únicos medicamentos aprobados para el tratamiento específico de la FPI, aprobados en 2014 por la FDA (por sus siglas en inglés, *Federal Drug Administration*) y la COFEPRIS. Estas moléculas bloquean la cascada fibrótica a distintos niveles y sus efectos se traducen en una disminución significativa del progreso de la fibrosis pulmonar en los pacientes sin llegar a detenerlo completamente, es decir, que los pacientes que resisten los efectos adversos de este tratamiento solo aumentan su supervivencia en un par de años.

Es así que el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas es de suma importancia, no solo dirigidas a detener el proceso fibrótico sino también a promover la degradación de la MEC acumulada y, restaurar así la arquitectura normal del pulmón y su funcionalidad. Este objetivo requiere de mayor trabajo de investigación, específicamente en un área poco explorada concerniente a los mecanismos que regulan la resolución de la fibrosis pulmonar y los actores involucrados en ella.

En el pasado, una de las limitantes a este fin fue la creencia de que la fibrosis era un proceso irreversible, y etapa final a un proceso de cicatrización aberrante. Sin embargo, un número creciente de evidencia ha demostrado que la fibrosis, debido a su naturaleza

altamente plástica, puede resolverse en ciertas circunstancias. Dentro de este cuerpo de evidencia se encuentran los modelos animales de fibrosis pulmonar en los que en la mayoría la fibrosis es reversible, con una restitución completa o casi completa de la arquitectura pulmonar después de la eliminación del agente, desarrollados principalmente mediante lesiones agudas o enfoques transgénicos, como lo es la administración intratraqueal de bleomicina. Aún con este conocimiento, la resolución de la fibrosis en los modelos animales permanece puntualizada como un defecto de los modelos de una enfermedad crónica-progresiva y los estudios en esta área se enfocan en promover el proceso más que en entender su biología.

Debido a que uno de los eventos clave en la FPI es la acumulación excesiva de MEC en el intersticio, producida principalmente por fibroblastos y miofibroblastos, su degradación proteolítica es de vital importancia y definición de la resolución de la fibrosis. Dicha función recae primordialmente en la familia de las MMPs, principal grupo de enzimas que regulan la composición célula-matriz y el recambio de la MEC, por lo que en un inicio se pensaron como importantes actores antifibróticos en la FPI. Sin embargo, a raíz de varios, pero aún escasos estudios esta concepción ha cambiado y actualmente es claro que mientras MMPs como la MMP19 juegan un papel antifibrótico, otras como la MMP7, MMP9 y MMP3 tienen un rol profibrotico.

En este contexto, la MMP13, principal enzima encargada de procesar y degradar a la colágena fibrilar tipo I y II en roedores, es un blanco de gran interés en el estudio de la resolución de la fibrosis pulmonar. Aunque su blanco principal es la colágena tipo II, estudios en pacientes con FPI demuestran un incremento significativo de su expresión en biopsias pulmonares, lo que sugiere una implicación activa en la patología. Por otro lado, su papel proresolutivo en modelos de fibrosis hepática inducida con CCl₄ es claramente evidenciado por los estudios de Fallowfield *et al.* (2007), en donde su deficiencia provoca un retraso en la resolución.

La implicación de la MMP13 en la resolución de la fibrosis pulmonar aún no es clara, y sumado a esto los estudios que han evaluado su implicación en la fibrogenesis resultan contradictorios en los distintos modelos de lesión (radiación, fármacos, estrés oxidante, etc.). Lo que hasta hoy sabemos de la relación MMP13-resolución proviene de estudios

realizados en modelos animales de fibrosis hepática, mismos en los que se ha observado que los macrófagos (células de Kupffer) son las principales células implicadas en la producción de MMP13 durante la resolución de la fibrosis, ya que su eliminación selectiva produce un retraso en el proceso.

Los macrófagos son las células del sistema inmune que se encuentran en mayor proporción en el tejido pulmonar y juegan rol crucial en la homeostasis, protegiendo contra agentes patógenos del medio externo, así como en la fibrosis pulmonar como más recientemente se ha evidenciado. Estas células exhiben una actividad regulatoria crítica en todos los estadios de la fibrosis pulmonar y con frecuencia se encuentra en estrecha proximidad a los miofibroblastos productores de colágena, y pueden secretar una gran variedad de mediadores profibróticos solubles, quimiocinas, y MMPs. Desde principios de la década los estudios de Gibbons *et al.* (2011) evidencian que los macrófagos alveolares juegan un rol importante en la resolución de la fibrosis pulmonar en el modelo de bleomicina, en donde su eliminación provoca un retraso en la resolución, sugiriendo una población proresolutiva la cual no se ha caracterizado hasta la fecha.

Además, también se sabe que los macrófagos pueden desempeñar un papel multifactorial promoviendo la resolución de la fibrosis, como productores de enzimas que participan en la degradación de la colágena, como la MMP13, así como captadores de sus productos para su catabolismo intracelular. Sin embargo, clarificar estas hipótesis requiere de mayor investigación del proceso resolutivo en los modelos animales disponibles.

HIPÓTESIS

La resolución de la fibrosis pulmonar en el ratón deficiente de la enzima MMP13 será anormal debido a la ausencia de la enzima MMP13 en el pulmón, ya que es una de las principales enzimas involucradas en la resolución de la fibrosis.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar la relevancia de la enzima MMP13 en la resolución de la fibrosis pulmonar.

Evaluar la importancia de los macrófagos en la resolución de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, mediante su eliminación utilizando clodronato contenido en liposomas, así como su implicación en la producción de MMP13 utilizando ratones silvestres y deficientes de esta enzima *MMP13*^{-/-}.

Objetivos particulares.

- Inducir fibrosis pulmonar en ratones silvestres y mutantes deficientes de la enzima MMP13, mediante la instilación intratraqueal de bleomicina.
- Evaluar la expresión de *Mmp13* a nivel de mRNA y proteína durante el curso temporal del modelo de fibrosis pulmonar experimental inducido por bleomicina.
- Eliminar la población de macrófagos alveolares (AMs) durante la etapa de resolución de la fibrosis del modelo de bleomicina, mediante administración intratraqueal semanal de clodronato.

- Evaluar la expresión de marcadores de macrófagos (F4/80 y Ym1) mediante *immunoblot* y técnicas inmunohistoquímicas, para determinar la efectividad de la depleción de macrófagos.
- Evaluar si los pulmones tratados con Bleomicina y Bleomicina + Clodronato difieren en sus características morfológicas, histológicas (específicamente durante la resolución de la fibrosis) y de supervivencia.
- Cuantificar el contenido de hidroxiprolina como biomarcador de colágena, en ratones silvestres y mutantes, en los dos tratamientos empleados durante la etapa resolutive.
- Evaluar por *immunoblot* la expresión de la enzima MMP13 en ratones mutantes y silvestres en los dos tratamientos, así como la expresión de marcadores de fibrosis.
- Determinar la localización en el pulmón de la enzima MMP13 en ratones instilados con Bleomicina + Clodornato mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- Evaluar el potencial colagenolítico del tejido pulmonar de ratones silvestres y mutantes en los dos tratamientos mediante un ensayo de degradación de colágena tipo I.
- Evaluar el potencial colagenolítico de la colagenasa 3 en ratones silvestres y mutantes de los dos tratamientos mediante un ensayo de actividad de la enzima MMP13.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Para este estudio se utilizó la cepa C57BL/6 la cual fue mantenida en el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y todos procedimientos realizados fueron aprobados y desarrollados de acuerdo al comité de ética de dicha institución.

Ratones hembras y machos, silvestres y deficientes de la colagenasa 3 *Mmp13*^{-/-} de 8 a 12 semanas fueron empleados como modelo animal en este estudio. Dichos ratones se generaron a partir de la construcción de fragmento de DNA recombinante en el que a la secuencia del gen *Mmp13* obtenido, de una biblioteca genómica, se le agregó un codón de término (TAA) en el codón F262, alterando la codificación de la secuencia del sitio de unión a zinc del dominio catalítico. Sin embargo, aunque este fragmento codifica para una proteína trunca, el exón 5 en donde se encuentra la modificación es removido por *splicing* durante la maduración del mRNA, alterando la secuencia en el sitio catalítico y generando una enzima no funcional.

Los fragmentos generados se linearizaron en un polilinker 5'- 3' e internalizaron por electroporación en células troncales embrionarias de *Mus musculus*. Dichas células se inyectaron en blastocistos de ratones C57BL/6 obteniendo una camada de ratones quiméricos con células de la línea germinal portando el gen *Mmp13* mutado. Machos quiméricos se cruzaron con hembras C57BL/6 WT y posteriormente se evaluó el genotipo de la progenie mediante *Southern Blot* y PCR. Dicho ratón fue proporcionado por la Universidad de Oviedo, por el grupo de López-Otín.

Utilizando estos ratones deficientes e la MMP13 y ratones WT se establecieron 2 tratamientos con Bleomicina y Bleomicina + Clodronato contenido en liposomas. Estos modelos experimentales se describirán a continuación.

Modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

La instilación de bleomicina, un agente antineoplásico que produce fibrosis pulmonar en pacientes con cáncer que reciben este tratamiento de manera dosis dependiente, y que en la actualidad es el modelo más utilizado en el estudio de la FPI, fue administrado de manera intratraqueal a ratones de 8-12 semanas en el día 0 del curso temporal el cual presenta etapas bien definidas (Inflamación, fibrosis y resolución) (**Figura 17**). Previamente anestesiados con una solución 1:10 de pentobarbital sódico, a los ratones se les introdujo un catéter desde la boca hasta la tráquea, cuidando no dañar las vías respiratorias, por el cual se administró una dosis única de 0.05U de bleomicina.

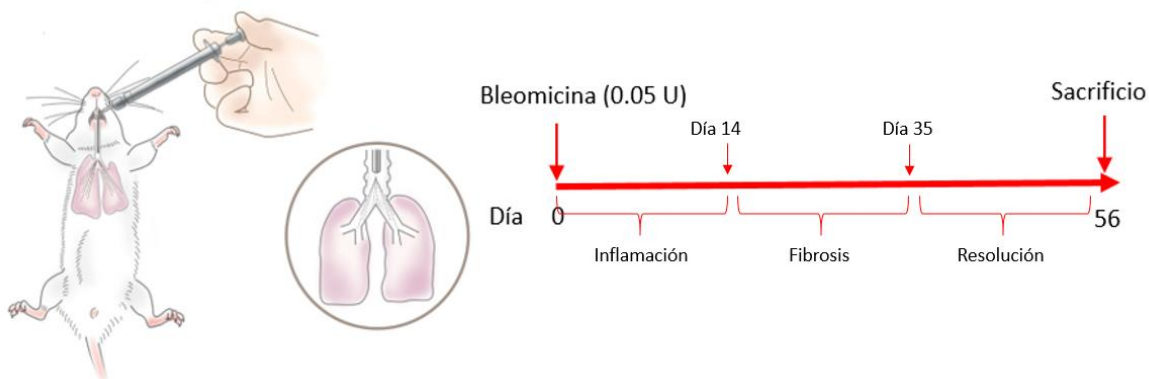


Figura 17. Modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. El día 0 se administraron 0.05 U de bleomicina disuelta en 50 μ L de agua inyectable por vía intratraqueal. Los ratones fueron sacrificados en distintas etapas como lo indica el esquema para extraer el pulmón y determinar el grado de fibrosis.

Los ratones fueron sacrificados a los 7 (etapa inflamatoria), 28 (etapa de fibrosis), 35 y 56 (etapa resolutive) días postinstilación mediante la administración intraperitoneal de una solución de pentobarbital sódico 1:1. Al momento del sacrificio y previo a la extracción de los pulmones, se realizó una perfusión con 5 ml de solución salina introduciendo la solución a presión por el ventrículo derecho tratando de no dañar el tejido. Posteriormente se realizó un lavado bronquioalveolar con solución salina cuidando no colapsar las paredes bronquiales, dicho lavado se utilizó para realizar una cuantificación de células inflamatorias.

Finalmente, una vez que se extrajeron los pulmones, el pulmón izquierdo fue fijado por instilación a presión constante con paraformaldehído (4%) en solución salina y el pulmón derecho congelado a -80°C para experimentos posteriores.

Modelo de eliminación de macrófagos

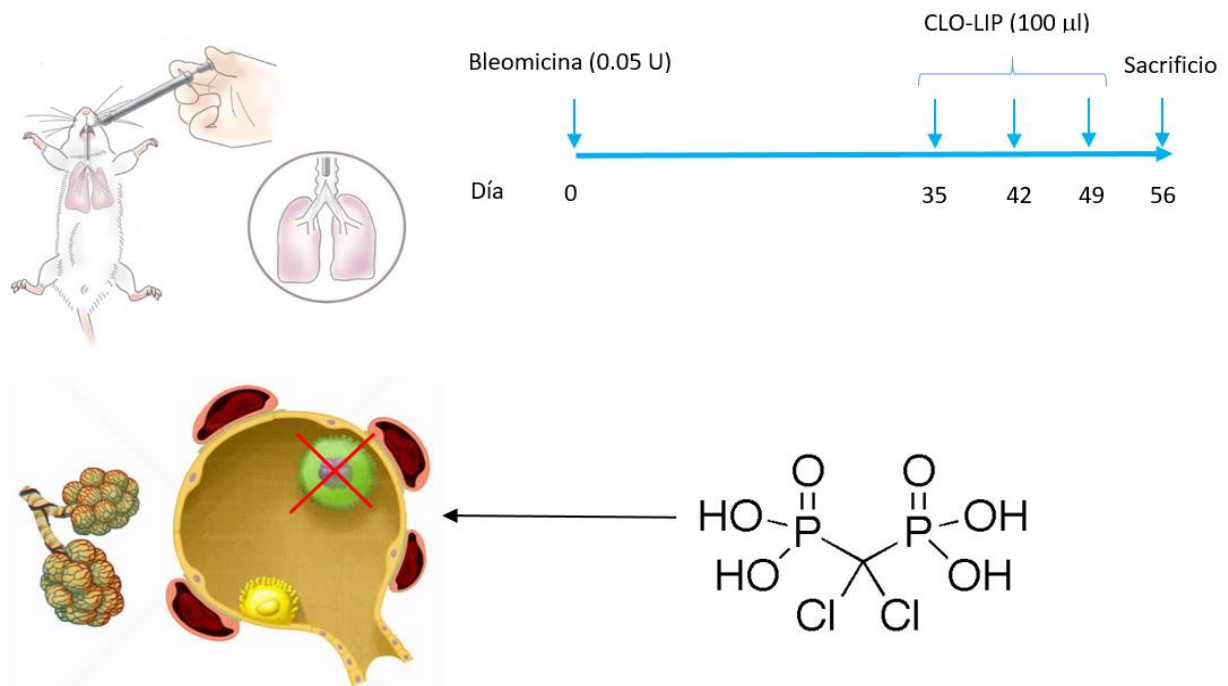


Figura 18. Modelo de eliminación de macrófagos. La administración de los liposomas elimina principalmente a los macrófagos alveolares ubicados entre la mucosa pulmonar y el ambiente externo.

Con el objeto de estudiar el papel de los macrófagos durante la resolución de la fibrosis, se instiló clodronato por vía intratraqueal a ratones tratados con bleomicina.

Los ratones fueron instilados con 100 μl de clodronato utilizando la misma técnica descrita anteriormente para la administración de bleomicina. Los ratones recibieron una dosis semanal a las 5, 6 y 7 semanas del modelo de bleomicina, periodo que abarca la etapa resolutoria de la fibrosis y en la cual se deseaba evaluar el papel de los macrófagos, la administración a distintos tiempos se realizó para evitar la repoblación de macrófagos en el

tejido. Finalmente, los ratones fueron sacrificados en el día 56 mediante la administración intraperitoneal de una solución de pentobarbital sódico 1:1, y los procedimientos post-sacrificio fueron los descritos anteriormente para los ratones con el tratamiento único de bleomicina.

Evaluación semicuantitativa del porcentaje de fibrosis

El pulmón izquierdo de cada caso, previamente fijado en paraformaldehído (4%) fue deshidratado y embebido en parafina y se realizaron cortes de 3 μ m. La extensión y grado de las lesiones, así como el porcentaje de inflamación y fibrosis fueron evaluados después de la tinción de Masson y Hematoxilina-Eosina. La extensión de la fibrosis en el pulmón de los ratones instilados con bleomicina fue determinado al multiplicar la extensión de la lesión por el porcentaje de fibrosis mediante el *software* Nis-Elements (Nikon).

Purificación de RNA y perfil de expresión de la MMP13

Aproximadamente 100 mg de tejido se homogenizaron en 1 ml de Trizol (Invitrogen), y la extracción de mRNA se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante. 1 μ g de mRNA se utilizó para la síntesis de cDNA mediante un kit de síntesis de cDNA (ThermoScientific) y el procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante. El cDNA se utilizó para medir la expresión de *mmp13* mediante el uso de taqman (FAM) durante el curso temporal del modelo de fibrosis inducida por bleomicina.

Cuantificación de hidroxiprolina pulmonar

Aproximadamente 100 mg de tejido fresco (pulmón derecho) se homogenizó en 500 μ l de H₂O estéril y posteriormente se llevó a un volumen final de 1 ml agregando 500 μ l de HCl 12N, para tener una concentración final de HCl 6N. La hidrólisis ácida se llevó a cabo durante 24 horas a una temperatura de 110°C, para romper las proteínas a nivel de aminoácidos.

El hidrolizado se colocó en tubos *ependorf* de 1.5 ml y se centrifugó 1400 rpm. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 20 µl a las que se le agregaron 20 µl de Buffer de citratos (pH 6). Posteriormente, se preparó el reactivo de Ehrlich (Paradimetilaminobenzaldehído 1.5 g; n-Propanol 6.6 ml; ácido perclórico 3.3 ml) y la Cloramina T (Cloramina T 0.14 g; Buffer de citratos pH6 8 ml; H₂O 1 ml; n-Propanol 1ml) para realizar la cuantificación de hidroxiprolina.

En placa de 96 pozos se colocaron 100 µl de Cloramina T y 20 µl/pozo de las muestras o 10 µl/pozo de la curva patrón de 4-hidroxiprolina (1, 2, 4, 6, 8, y 10 microgramos) por duplicado dejando incubar la placa a temperatura ambiente por 20 min. Se colocaron 100 µl de reactivo de Ehrlich a cada pozo y se dejó incubar la reacción por 65°C por 30 min. Finalmente se leyó la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (Synergy-H1, BIOTEK) y se analizaron los resultados obtenidos.

Extracción y cuantificación de proteína total

Se utilizaron aproximadamente 50 mg de tejido fresco (pulmón derecho) mantenido a -80°C hasta su uso. El tejido fue homogenizado en 500 µl de buffer RIPA (0.5% Na desoxicolato, 0.1% SDS, y 1% NP-40) y centrifugado a 11000 rpm a 4°C por 10 min. Se recuperó el sobrenadante (fase acuosa) en tubos *ependorf* estériles de 1.5 ml y se tomaron alícuotas de 10 µl en tubos estériles de 0.6 ml para realizar la cuantificación de proteínas, almacenando la muestra restante a -20°C para su empleo en pruebas posteriores.

La cuantificación de proteína se realizó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific), en placa de 96 pozos. Se colocaron 150 µl de BCA/pozo y 1 µl de la muestra o 10 µl de la curva patrón 1:10 de albúmina (1, 2, 4, 6, y 10 microgramos) por duplicado, incubando la reacción a 37°C por 30 min. Finalmente se leyó la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (Synergy H1, BIOTEK) y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener la concentración/µl de cada una de las muestras.

Ensayo de degradación de colágena tipo I

Mediante el empleo de la colágena tipo I conjugada con FITC se puede realizar un ensayo proteolítico incubando ésta colágena fluorogénica en presencia de colagenasas contenidas en el extracto de pulmón. Para evaluar la actividad colagenolítica del pulmón de ratones WT y Mmp13 KO, y de los macrófagos derivados del lavado bronquio alveolar (BALF), se utilizaron 10 µg de extracto total de proteínas diluidos en 50 µl de H₂O estéril. Se colocaron los 50 µl de extracto total de proteína en una placa de 96 pozos, y se agregaron 50 µl de colágena tipo I conjugada con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Anaspec) a una concentración final de 10 µg/ml, dicho procedimiento fue realizado en completa oscuridad para evitar el fotoblanqueo (*photobleaching* o la destrucción fotoquímica del fluoróforo). La placa, debidamente cubierta para impedir el paso de luz, se incubó a 37°C por 1 hora. Al finalizar la reacción se leyó la cantidad total de fluorescencia a Ex/Em=490/520 nm con una ganancia del 100% en un lector de microplacas (Synergy H1, BIOTEK). El valor de la señal fluorescente de los pozos control, que solo contenían colágena-FITC se sustrajo del valor de fluorescencia obtenido en los pozos correspondientes a los lisados de células o tejidos.

Ensayo de actividad de la enzima MMP13

Para evaluar la actividad colagenolítica específica correspondiente a la enzima MMP13 en las muestras de extracto de pulmón derivado de ratones WT y Mmp13 KO, se utilizaron 10 µg de extracto total de proteína diluido en 50 µl de H₂O estéril. Para la activación de la enzima, se agregó 1 µl de acetato 4-aminofenilmercurico (CH₃CO₂HgC₆H₄NH₂ o APMA) (Anaspec), a una concentración final de 1 Mm y se incubaron las muestras a 37°C por 40 min.

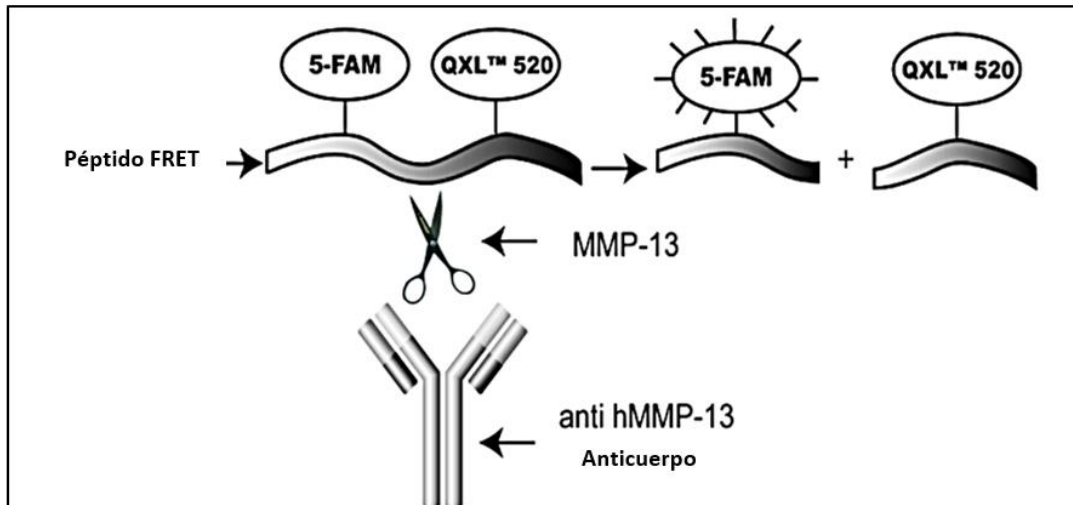


Figura 20. Principio del *kit* utilizado para el ensayo de actividad de la enzima MMP13. La enzima MMP13 contenida en la muestra biológica es capturada por anticuerpo anti-MMP13 inmovilizado y su actividad proteolítica es medida por el péptido FRET 5-FAM/QXL™520. La fluorescencia de la 5-FAM (fluoróforo), es reprimida por QXL™520 (apagador) en el péptido intacto. Una vez que la MMP-13 lo corta, la fluorescencia de la 5-FAM se recupera y puede ser monitoreada a Ex/Em=490 nm/520 nm.

Se agregaron 50 μ l/pozo de sustrato MMP13 (5-FAM / QXL™520) (Anaspec), un péptido que emplea la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), a una placa de 96 pozos y se incubaron con 50 μ l de MMP13 activa o 50 μ l de la curva patrón (0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 μ M de 5-FAM-Pro-Leu-OH) (Figura X) a 37°C por 1 hora en completa oscuridad. En el péptido intacto, la fluorescencia de la 5-carboxyfluoresceína (5-FAM) es reprimida por la unión con QXL 520, el cual es un el represor con una absorción que se adapta o “coincide” perfectamente con la emisión de la 5-FAM. Una vez el péptido es cortado por la MMP13 en dos fragmentos, se recupera la fluorescencia de la 5-FAM y puede ser cuantificada a una longitud de onda de excitación/emisión=490/520 nm (**Figura 20**).

Una vez finalizada la incubación se añadieron 50 μ l de solución de paro (Anaspec) a cada pozo y finalmente se leyó la fluorescencia a Ex/Em=490/520 nm con una ganancia del 65% en un lector de microplacas (Synergy H1, BIOTEK).

El mecanismo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) implica la presencia de un fluoróforo donante en un estado electrónico excitado (5-FAM), que puede

transferir su energía de excitación a un cromóforo aceptor cercano (QXL 520) a través de interacciones dipolo-dipolo de largo alcance. La teoría que sustenta la transferencia de energía se basa en el concepto de tratar un fluoróforo excitado como un dipolo oscilante que puede sufrir un intercambio de energía con un segundo dipolo que tiene una frecuencia de resonancia similar. De esta manera, al romper la interacción de estas dos moléculas mediante acción enzimática, en este caso de la colagenasa 3, se pierde el aceptor de energía y el donante queda en un estado excitado y recupera su fluorescencia.

Inminodetección por ensayos tipo Western blot

La expresión de distintas proteínas (marcadores profibróticos y marcadores de macrófagos) fue evaluada por *Western Blot*. Se realizó una electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE 8- 13%) utilizando 25 µg diluidos en 10 µl de H₂O estéril y *buffer* muestra 1X (BioRad). Una vez finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (BioRad) en presencia de *buffer* de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%). Las membranas se incubaron en agitación constante en solución bloqueadora (BioRad) que contenía leche libre de grasa al 3% diluida en *buffer* Tris salino 1X (Tris 20 Mm, NaCl 150 Mm) para evitar interacciones inespecíficas y posteriormente se incubaron con anticuerpos primarios específicos a 4°C por 24 horas.

Las membranas se lavaron 3 veces con *buffer* TBS 1x +TWEEN 20 al 0.05% por 10 min en agitación constante, para remover cualquier interacción inespecífica del anticuerpo primario. Posteriormente las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios contra IgGs de ratón o de conejo por 1 hora en agitación constante y posteriormente se realizaron otros 3 lavados, para eliminar uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. Finalmente, se revelaron las membranas por quimioluminiscencia (luminol + H₂O₂) y se capturaron imágenes de las mismas en un transiluminador (ChemiDoc™ XRS+, BioRad) para posteriormente realizar las densitometrías de las bandas utilizando el *software* Quantity One (BioRad). Las densitometrías se normalizaron utilizando β-actina.

Inmunohistoquímica

Para la localización de la MMP13 así como otros marcadores se realizó una inmunohistoquímica. Para esto, los tejidos previamente incluidos en parafina se desparafinaron por 30 min en xilol y fueron rehidratados con concentraciones decrecientes de etanol (100%, 90% y 50%) hasta rehidratar completamente en H₂O. Debido a que esta técnica utiliza la actividad de la peroxidasa para revelar la interacción antígeno-anticuerpo, se eliminó la peroxidasa endógena incubando con H₂O₂ (3%) en metanol durante 30 min a temperatura ambiente. Con el fin de romper las interacciones formadas por la fijación del tejido, se realizó la recuperación de antígenos calentando las laminillas por 4 min en presencia de *buffer* de citratos (pH6). Para evitar interacciones inespecíficas antígeno-anticuerpo, el tejido se incubó con solución bloqueadora universal 1X () y suero de borrego 1:100 diluido en *buffer* de fosfatos salino 1X (PBS 1X). Posteriormente los tejidos se incubaron en anticuerpo primario específico a 4°C por 24 horas.

Los tejidos se incubaron en anticuerpo secundario acoplado a biotina y un complejo streptavidina-peroxidasa (BioGenex) por 30 min. Finalmente, el revelado de la técnica se hizo incubando los tejidos con 3-amino-9-etilcarbazol (BioGenex), como cromógeno en *buffer* de acetatos con 0.05% de H₂O₂ y finalmente los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina.

Análisis estadístico

Los resultados presentados en esta tesis fueron expresados como media \pm desviación estándar. El valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. En las gráficas de caja y bigotes, las líneas horizontales representan la mediana y los percentiles 25 y 75, y los bigotes representan valores mínimos y máximos. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student de dos colas. En experimentos con más de dos grupos, las diferencias se analizaron mediante ANOVA de dos vías. El programa Prism versión 6.0 (Graph-Pad Software Inc.) se utilizó para la elaboración de las gráficas y los análisis estadísticos.

RESULTADOS

Expresión de la MMP13 después de la inducción de fibrosis con bleomicina.

Estudios demuestran que la MMP13 se encuentra incrementada en pacientes con FPI, tanto a nivel de mRNA, como de proteína evaluada por *inmunoblot* (Nkyimbeng *et al.*, 2013). De igual manera, otros estudios mostraron una sobreexpresión de MMP13 particularmente durante la etapa de resolución en la fibrosis hepática a nivel de transcritos (Fallowfiel *et al.*, 2007), sin embargo, si la expresión de la MMP13 aumenta en la resolución de la fibrosis pulmonar aún no se ha evaluado en estudios previos. Con el fin de analizar el papel de la MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar con respecto a las demás etapas del modelo de bleomicina, se trataron ratones de 8 a 12 semanas con bleomicina y se evaluó a diferentes tiempos del modelo la expresión de la MMP13 por RT-qPCR e *inmunoblot* (7, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días postinstitución). Mientras la expresión del mRNA fue casi indetectable en el tejido pulmonar de ratones no tratados, está aumenta significativamente durante las etapas: inflamatoria, fibrosante y de resolución de la fibrosis, presentando 2 picos de expresión a los 7 y 35 días postinstitución, disminuyendo progresivamente hasta alcanzar niveles basales a los 56 días (**Figura 21 A**). Dicho comportamiento es también observado a nivel de proteína (**Figura 21 C-D**).

Debido a que las MMPs presentan distintos mecanismos de regulación tanto posttranscripcionales como posttraduccionales, se determinó la actividad de esta enzima en el sobrenadante del extracto del tejido pulmonar a diferentes tiempos del modelo (7, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días postinstitución), con el fin de obtener mayor información acerca del rol de la MMP13. Para esto se utilizó un *kit* que contenía un anticuerpo específico monoclonal anti-MMP13 en combinación con un sustrato de MMP fluorogénico. Nuevamente se observó un incremento significativo a los 7 y 35 días en la actividad de la MMP13 (**Figura 23 B**), lo cual correlaciona con los niveles de proteína y de expresión de esta enzima (evaluada por RT-qPCR). Estos resultados sugieren un papel de la colagenasa 3 durante la etapa inflamatoria, así como durante la resolución de la fibrosis pulmonar.

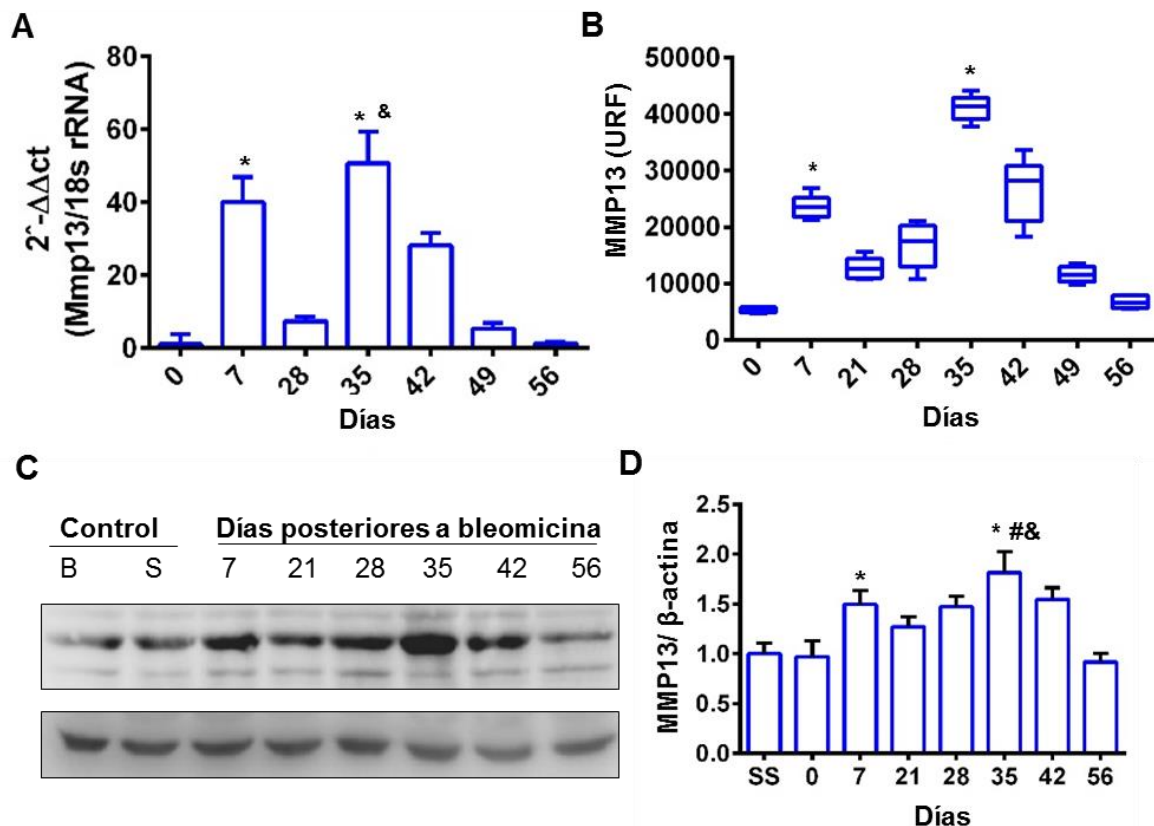


Figura 21. Expresión de MMP13 después del daño pulmonar inducido por bleomicina. Se administró bleomicina o solución salina a ratones WT C57BL6 mediante instilación intratraqueal y se obtuvieron los pulmones en los puntos indicados. **(A)** Nivel de mRNA de *Mmp13* en tejido pulmonar de ratones WT control y tratados con bleomicina. **(B)** Actividad de MMP13 en unidades de fluorescencia relativa (RFU) determinada en el sobrenadante del extracto de tejido pulmonar, utilizando un sustrato fluorescente inactivado. **(C)** *Inmunoblot* representativo de la proteína MMP13 en extractos de tejido pulmonar de ratones control y ratones tratados con bleomicina (izquierda). Densitometría (derecha). Se utilizó β -actina como control de carga. La gráfica de barras muestra el análisis densitométrico y representa la media \pm desviación estándar. La gráfica de caja y bigotes representa la media \pm DE (n = 6 ratones / grupo). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA de dos colas (p < 0.05, * en comparación con el control, y 7d vs 35d, # 35d vs 56d).

Localización celular de la MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar.

Se ha observado que diferentes tipos celulares expresan la enzima MMP13 (células epiteliales alveolares y bronquiolares, macrófagos alveolares) en pacientes con FPI. Para determinar la localización celular de esta enzima en el pulmón durante la resolución de la fibrosis, se utilizó una técnica inmunohistoquímica para identificar a las células MMP13 positivas en diferentes tiempos del modelo (35, 42, 49 y 56 días postinstilación) (**Figura**

22). A los 35 y 42 días se observa un incremento en la señal positiva para MMP13, localizada principalmente en macrófagos alveolares e intersticiales, los cuales se observan cercanos a las zonas de fibrosis durante una etapa temprana de la resolución y posteriormente también en los alveolos conforme el pulmón recupera su arquitectura normal. El número de células positivas disminuyó progresivamente hasta encontrar solo unas pocas células positivas para MMP13 a los 56 días. Esto evidencia a los macrófagos alveolares e intersticiales como fuente principal de MMP13 durante la resolución fibrosis pulmonar.

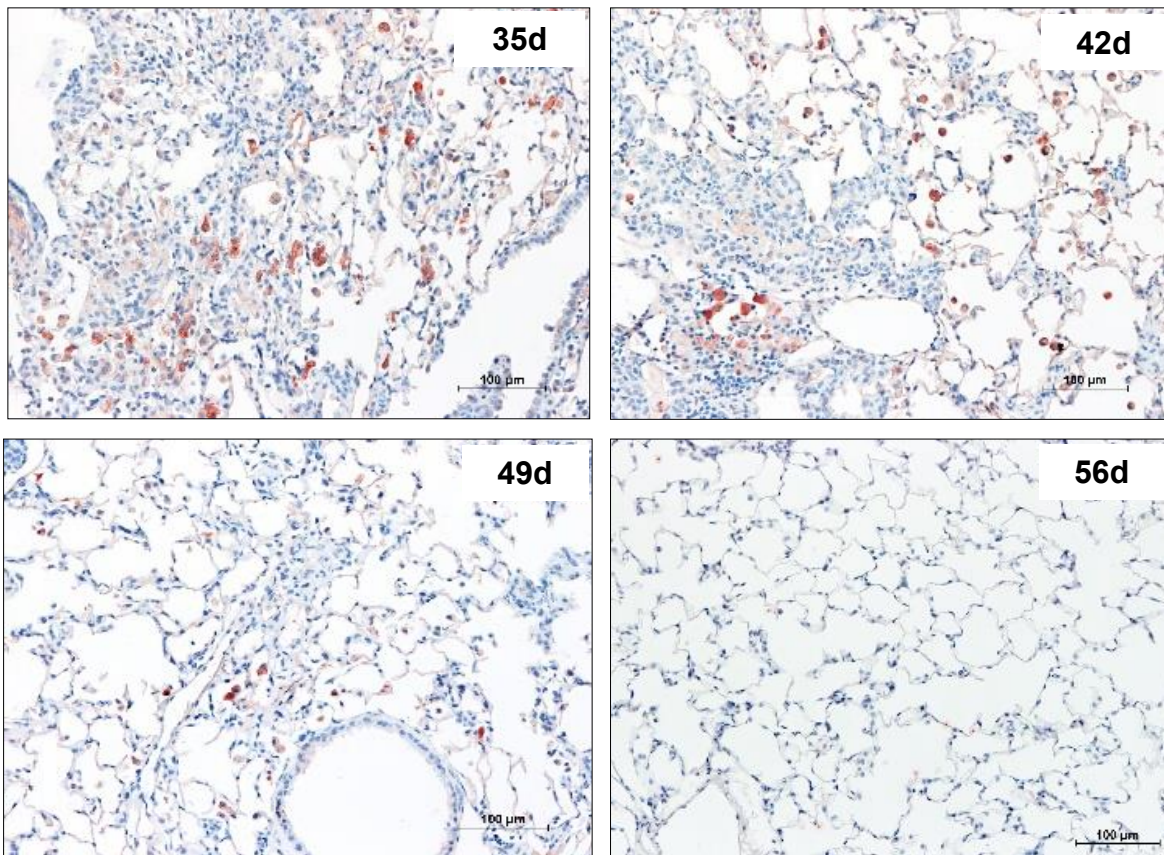


Figura 22. Localización celular de MMP13 después del daño pulmonar inducido por bleomicina durante la etapa de resolución de la fibrosis. Fotomicrografías representativas de tinción inmunohistoquímica realizadas con anticuerpos específicos contra MMP13, en cortes de pulmón de ratones control y tratados con bleomicina. La señal positiva se observa en rojo. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. Todas las imágenes fueron capturadas con un aumento original 20X (barras de escala, 100 µm).

Evaluación de la respuesta fibrótica en el ratón deficiente de la enzima MMP13.

Para determinar el efecto que tiene la enzima MMP13 en la resolución de la fibrosis, ratones silvestres y *Mmp13*^{-/-} fueron tratados con bleomicina y sacrificados a los 21, 28, 35, 42 y 56 días, es decir se siguió la evolución del modelo, para analizar si ocurría la resolución de la fibrosis, o la progresión de la misma. Como se muestra en la **Figura 23**, los ratones KO desarrollaron más fibrosis, en comparación a los silvestres. Pero además mientras que en el ratón silvestre ya no observan focos de fibrosis a los 56 días, en el ratón *Mmp13* KO vemos la presencia de pequeños focos de fibrosis. Adicionalmente, observamos el alargamiento de los alvéolos similar al enfisema, a los 56 días en ambos ratones, pero estos cambios estuvieron más exacerbados en el ratón *Mmp13* KO. Estos datos indican que en el ratón deficiente de *Mmp13* la resolución es anormal, debido a que hay persistencia de pequeños focos de fibrosis, en combinación con enfisema/ alargamiento de los alvéolos.

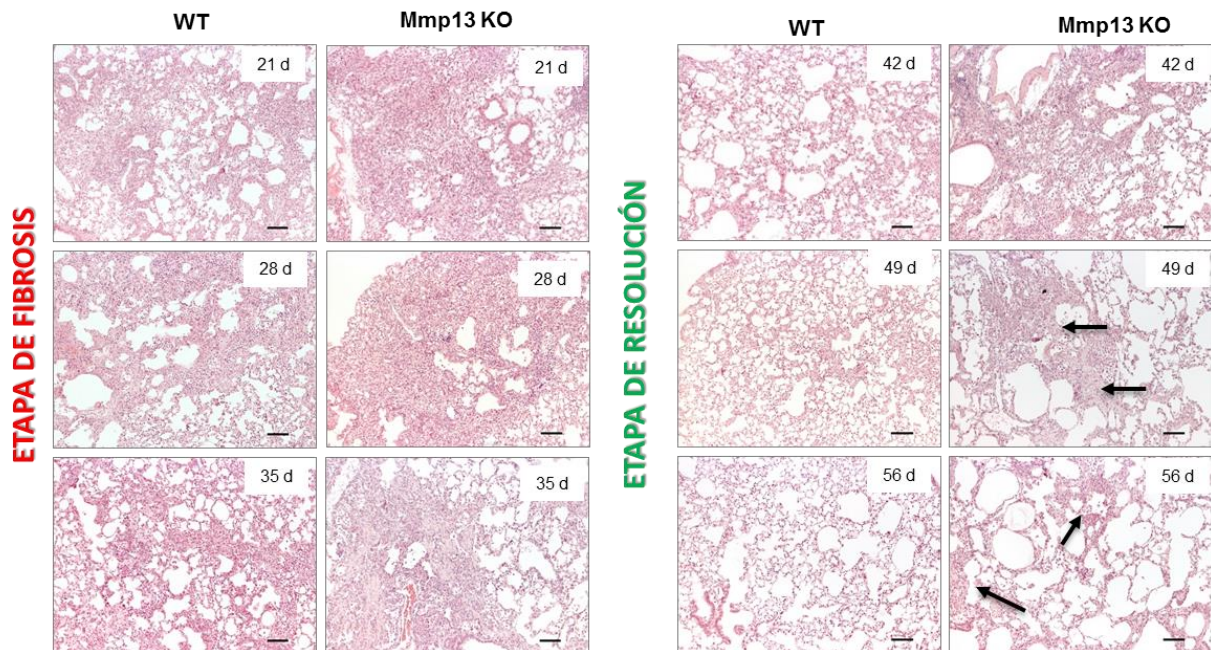


Figura 23. La deficiencia de *Mmp13* sensibiliza a los ratones a la fibrosis pulmonar experimental y retrasa la resolución de la fibrosis. Imágenes representativas de microscopía de luz, de cortes de tejido pulmonar teñidos con hematoxilina-eosina de ratones WT y *Mmp13*^{-/-} después de los días indicados posteriores al tratamiento con bleomicina. Todas las imágenes se capturaron con un aumento original de 10X (la barra de escala representa 100 μ m).

Para corroborar si la respuesta fibrótica en el ratón deficiente de *Mmp13* era mayor, evaluamos la concentración de hidroxiprolina en el pulmón de los ratones mutantes en comparación con los silvestres. La hidroxiprolina se deriva de la modificación postraduccional del aminoácido prolina, la estructura primaria de la colágena contiene el motivo repetitivo Gly-X-Y, donde la posición X y Y están ocupadas por prolina, y en donde frecuente Y es prolina hidroxilada, es por ello que la determinación de hidroxiprolina es usualmente utilizada como un indicador de fibrosis, en donde a mayor hidroxiprolina, mayor contenido de colágena en un tejido. Como se muestra en la gráfica de la **Figura 24**, el nivel de hidroxiprolina pulmonar y el porcentaje de fibrosis, fueron significativamente mayores en el ratón *Mmp13* KO a los 21, 28 y 35 días. Además, observamos que, a los 56 días el contenido de hidroxiprolina pulmonar en los ratones silvestres disminuye significativamente, alcanzando niveles basales, mientras que en el *Mmp13* KO permanece elevado. Las gráficas de la **Figura 24**, muestran que no hay progresión de fibrosis, debido a que en ambos grupos disminuye la hidroxiprolina al comparar el tiempo 28 días vs 56 días, es decir, en ambos grupos se observó reversión de la fibrosis, sin embargo, en el pulmón de los ratones *Mmp13* KO, esta resolución no fue completa. Estos datos indican que la actividad de la enzima MMP13 es necesaria para una regresión óptima de la fibrosis, sin embargo, no es el único mediador de la resolución, ya que existen otras metaloproteinasas y mecanismos que participan en la reparación tisular.

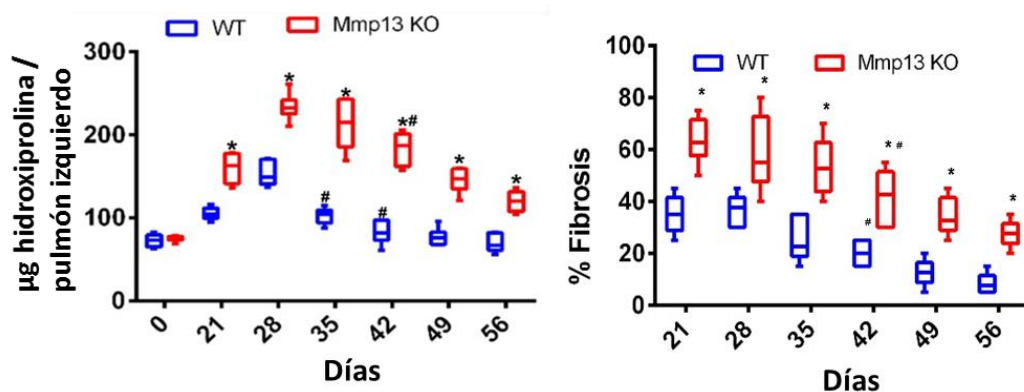


Figura 24. La deficiencia de *Mmp13* sensibiliza a los ratones a la fibrosis pulmonar experimental y retrasa la resolución de la fibrosis. Izquierda: Contenido de hidroxiprolina en los pulmones de ratones control

tratados con solución salina (tiempo 0) y tratados con bleomicina. Azul grupo silvestre y rojo grupo mutante (n = 6 ratones / grupo). Derecha: Porcentaje de extensión de la fibrosis del área del tejido dañado (n = 6 ratones / grupo). Los datos se presentan como gráficas de caja y bigotes con media \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student para la comparación de dos grupos y ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples ($p < 0.05$, (*) WT vs deficiente de Mmp13, (#) 28 d vs 35 y 42 días.

Eliminación de macrófagos pulmonares mediante la administración de Clodronato contenido en liposomas.

Con el fin de indagar si los macrófagos son la principal fuente de MMP13 durante la resolución de la fibrosis, se utilizó un modelo de eliminación selectiva de éstas células desarrollado por Van Roojjen y Van Nieuwmegen (1984), y adaptada por Thepen *et al.* (1989), que consiste en la instilación de liposomas con clodronato, una droga fagocitada por los macrófagos que induce apoptosis. Ratones silvestres (WT) y mutantes (Mmp13 KO) recibieron una dosis intratraqueal única de 0,05 U de bleomicina (50 μ l) el día 0 y los liposomas de clodronato (Clo-lip) se administraron por vía intratraqueal (100 μ l) los días 35, 42, 49 y fueron sacrificados en el día 56 (**Figura 25 A**). Diversos autores observaron que el efecto de la eliminación de los macrófagos por el clodronato se mantiene por 5 días (Bem *et al.*, 2008; Gibbons *et al.*, 2011), periodo después del cual se recupera la población en el pulmón, por tal motivo se realizó una instilación semanal durante el tiempo que dura la resolución en el modelo de bleomicina.

El tratamiento con bleomicina + clodronato incrementa la mortalidad de los ratones tanto WT como Mmp13 KO (**Figura 25 B**). Cabe mencionar que, aunque cuando se desarrolló la “técnica suicida” se señaló que la administración de clodronato contenido en liposomas es una técnica confiable la cual no daña a ningún otro tipo celular (Buiting y Van Roojjen, 1994), otros autores contradicen esta postura señalando que está técnica provoca, en distintos niveles, la eliminación de neutrófilos y cierto grado de toxicidad (Duffield *et al.*, 2005), por lo que no es clara la relevancia del aumento de la mortalidad inducida por clodronato, como efecto directo sobre la eliminación de los macrófagos.

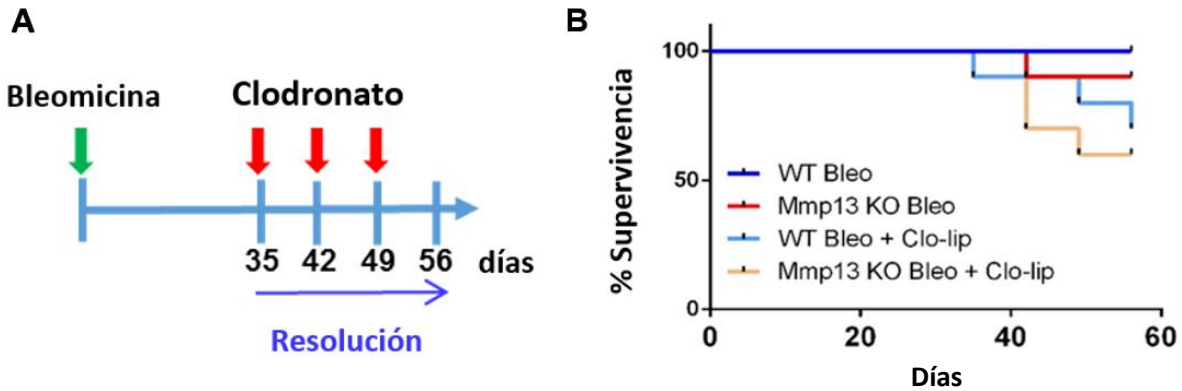


Figura 25. La administración de Clo-lip durante la resolución de la fibrosis pulmonar aumenta la mortalidad. A. Esquema representativo del protocolo experimental para la eliminación de macrófagos pulmonares durante la resolución de la fibrosis pulmonar. Ratones WT y *Mmp13* KO C57BL/6 recibieron una dosis única intratraqueal de 0.05 U de bleomicina (50 μ l) en el día 0 y el clodronato contenido en liposomas (Clo-lip) fueron administrados intratraquealmente (100 μ l) semanalmente en los días 35, 42, 49 y los ratones fueron sacrificados en el día 56. B. La supervivencia fue estimada por el método de Kaplan-Meier MEYER y comparadas por el *test* de log-rank. Una $p < 0.05$ fue considerada como significativa.

La eliminación de los macrófagos pulmonares produce un aumento en la respuesta inflamatoria durante la resolución.

La administración de clodronato durante la resolución de la fibrosis induce un incremento en el número total de células de BALF a los 42 y 56 días postinstilación de bleomicina (**Figura 26 A**). Aunque no se eliminó por completo la población de macrófagos, se observó una disminución significativa en el número de macrófagos en el pulmón tanto de ratones WT como de ratones *Mmp13* KO tratados con Bleo + Clo-lip a los 42 y 56 días después del tratamiento (**Figura 26 B**), sin embargo, este mecanismo de eliminación de macrófagos causa una respuesta inflamatoria alterada, caracterizada por un aumento significativo en la infiltración tanto de neutrófilos (PMNs) como de linfocitos (**Figura 26 C-D**). El número el número de linfocitos y neutrófilos permanece significativamente elevado en los animales tratados con bleomicina + clodronato, en comparación con los grupos tratados únicamente con bleomicina en ambos genotipos.

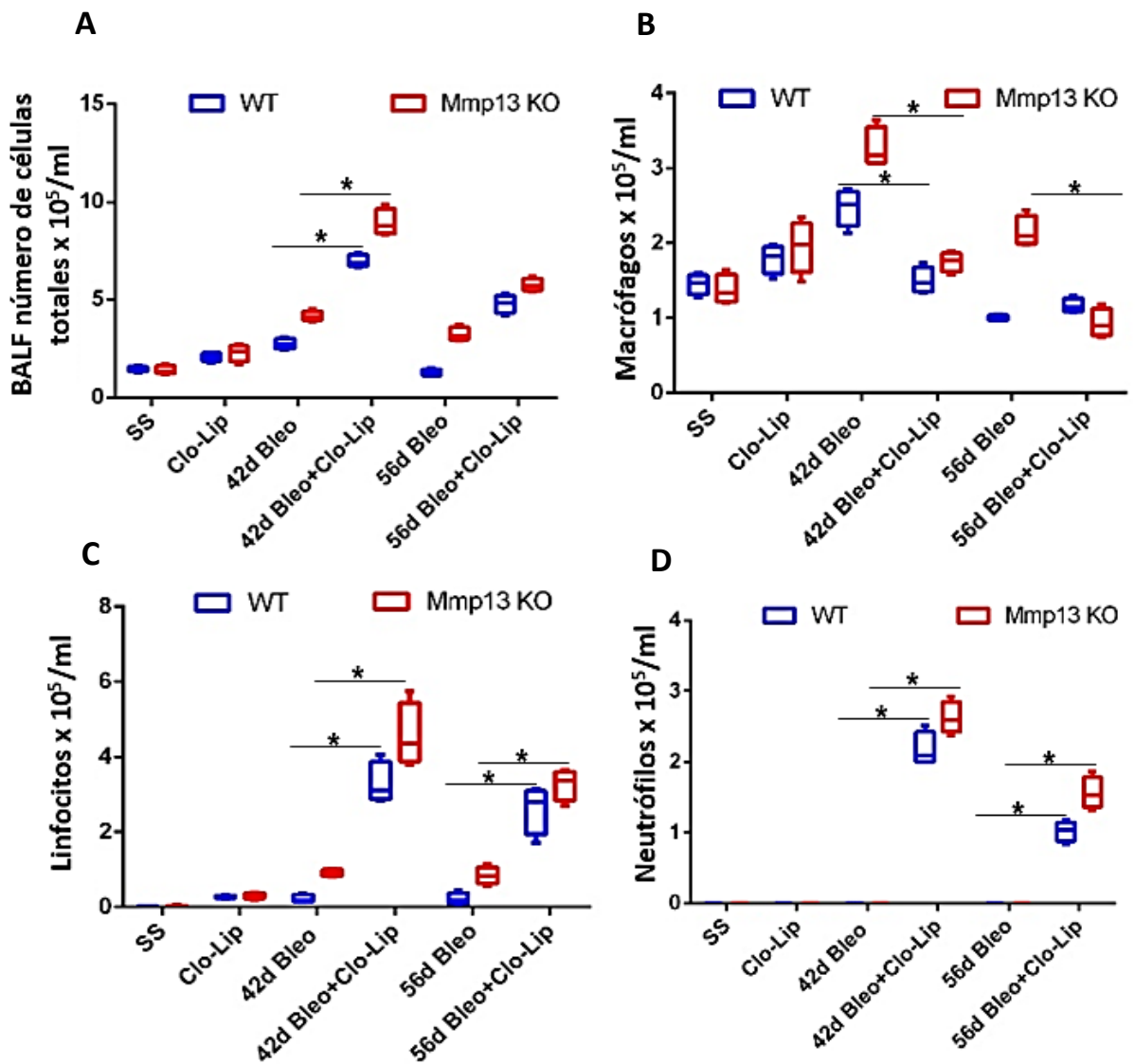


Figura 26. La eliminación de los macrófagos durante la resolución causa un incremento en la respuesta inflamatoria. Conteo celular total y diferencial de BALF de ratones WT y Mmp13 KO a los 42 y 56 días postinstilación con bleomicina. Se observa una disminución de macrófagos a los 42 y 56 días y un aumento de neutrófilos y linfocitos a los 42 días el cual persiste hasta los 56 días. Los datos son presentados como gráficas de cajas y bigotes con las barras horizontales representando la media \pm DE. La significancia estadística fue determinada por una ANOVA de dos vías ($p < 0.05$).

Estudios previos demuestran que la eliminación de los macrófagos produce un aumento en la respuesta inmune frente al daño y que células como linfocitos y neutrófilos, juegan un papel importante como reguladores de la inflamación (Thepen *et al.*, 1989-2006). Además, se sabe que la eliminación de células apoptóticas por los macrófagos evita el desarrollo de una respuesta inflamatoria aguda (Wynn y Barron, 2010), por lo que la falta de su actividad fagocítica, después de su eliminación podría explicar parcialmente este fenómeno.

De hecho, se observó hiperplasia del tejido linfoide asociado a bronquios o la formación de BALT (por sus siglas en inglés de *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*) (**Figura 27**). El BALT es un tejido linfático constitutivo de la mucosa adyacente a las vías respiratorias principales en algunas especies de mamíferos, incluidas ratas y conejos, pero no en humanos ni en ratones. Por lo que el BALT parece ser una estructura linfoide que no está presente en todas las especies de mamíferos, pero puede desarrollarse en el pulmón después de la estimulación. Esto contrasta con los órganos linfoides, como los ganglios linfáticos o las placas de Peyer, que siempre se pueden encontrar en todos los mamíferos. Estas diferencias entre especies son de gran importancia para interpretar la relevancia clínica de los experimentos en modelos animales que involucran al sistema inmunitario pulmonar. El BALT inducible (*iBALT*), es un tejido linfoide ectópico que se forma por una respuesta inflamatoria alterada o una infección, tanto en humano como en ratón (Randall, 2010).

En este estudio, como resultado de la eliminación de los macrófagos en el pulmón por el tratamiento con clodronato, se observó que tanto el grupo de animales control, que solo recibieron clodronato (**Figura 27 B**), como el grupo de animales que recibieron una combinación de bleomicina + clodronato (**Figura 28 B**), desarrollaron *iBALT*, mientras que los ratones control tratados con solución salina (**Figura 27 A**) o los ratones tratados solo con bleomicina (**Figura 28 A**) no presentaron este tejido linfoide. No se encontraron diferencias entre los ratones WT y Mmp13 KO, es decir, el desarrollo de *iBALT* estuvo asociado a la eliminación de los macrófagos y no estuvo asociado con la deficiencia de la enzima MMP13.

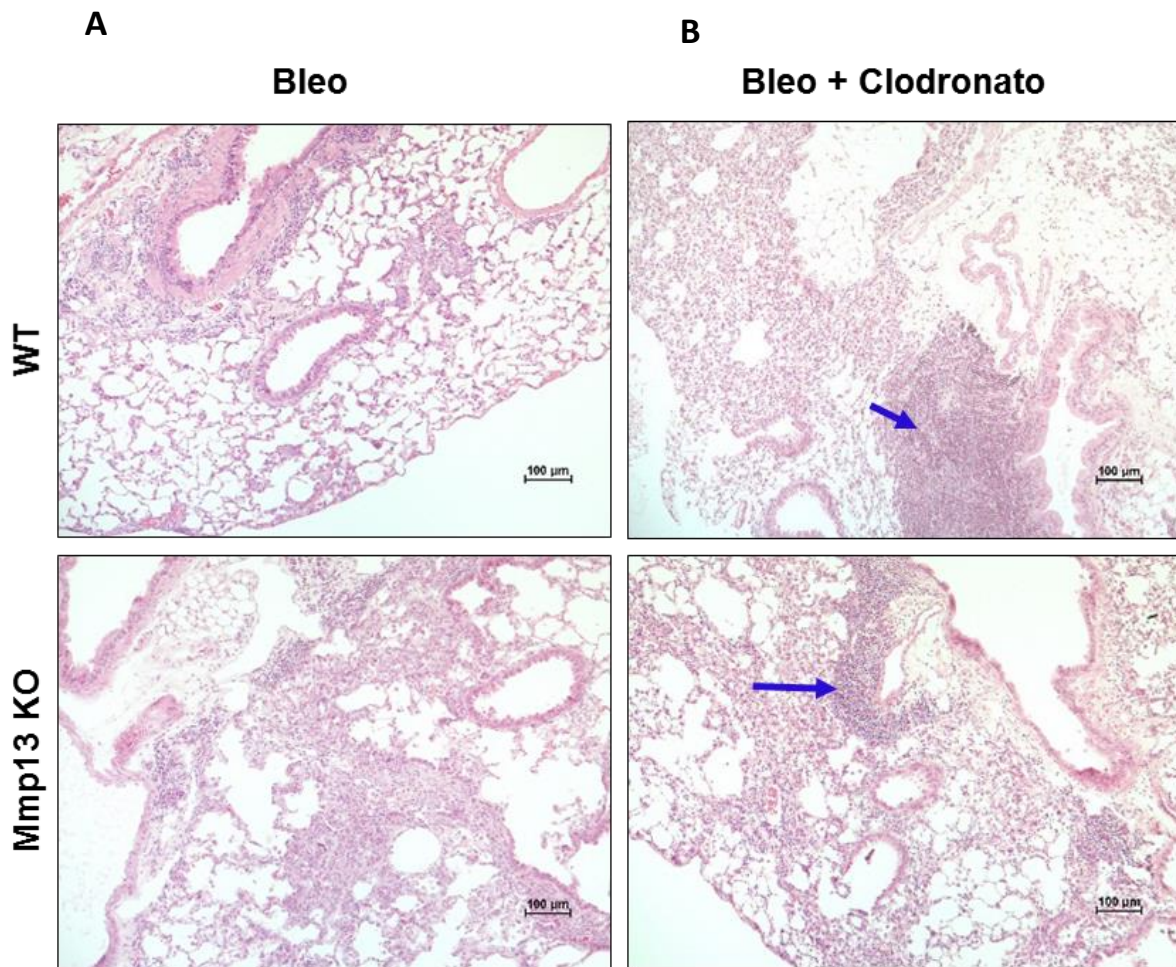


Figura 28. Desarrollo de tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) en ratones tratados con bleomicina y clodronato. Imágenes representativas de microscopía de luz de pulmones de ratones WT y Mmp13 KO teñidos con H y E, tratados con bleomicina (Bleo) o con bleomicina + clodronato (Bleo + Clo-lip). Las imágenes se capturaron con un aumento original de 10X (barras de escala, 100 μm).

Evaluación de la expresión de marcadores de macrófagos para determinar la eficacia de eliminación después de la administración de clodronato.

Con el fin de evaluar el grado de eliminación de macrófagos después de la administración de clodronato se realizó una inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico contra F4/80, el principal marcador de macrófagos, para localizar estas células en el tejido pulmonar. Se observaron solo unas pocas células F4/80 positivas en los ratones tratados con Bleo + Clo-lip en ambos genotipos en comparación con los tratados únicamente con bleomicina (**Figura 29**) lo que sugiere una eliminación efectiva de macrófagos. Es importante señalar que la eliminación de los macrófagos no fue total o absoluta. En relación

a este hecho, se ha demostrado que después de la eliminación de macrófagos a través de distintas estrategias, ocurre un reclutamiento de monocitos provenientes de sangre periférica y su posterior diferenciación hacia macrófagos en el tejido pulmonar, lo que resulta en la recuperación gradual de ésta población tanto en condiciones de homeostasis (Hashimoto *et al.*, 2013), como en modelos de fibrosis pulmonar (Misharin *et al.*, 2017). La población de monocitos Ly6C^{hi} ha sido identificada por Gibbons *et al.* (2011) como precursora de los macrófagos en el pulmón, por lo que dicha población puede ser la encargada de recuperar la población de macrófagos pulmonares en respuesta a su eliminación.

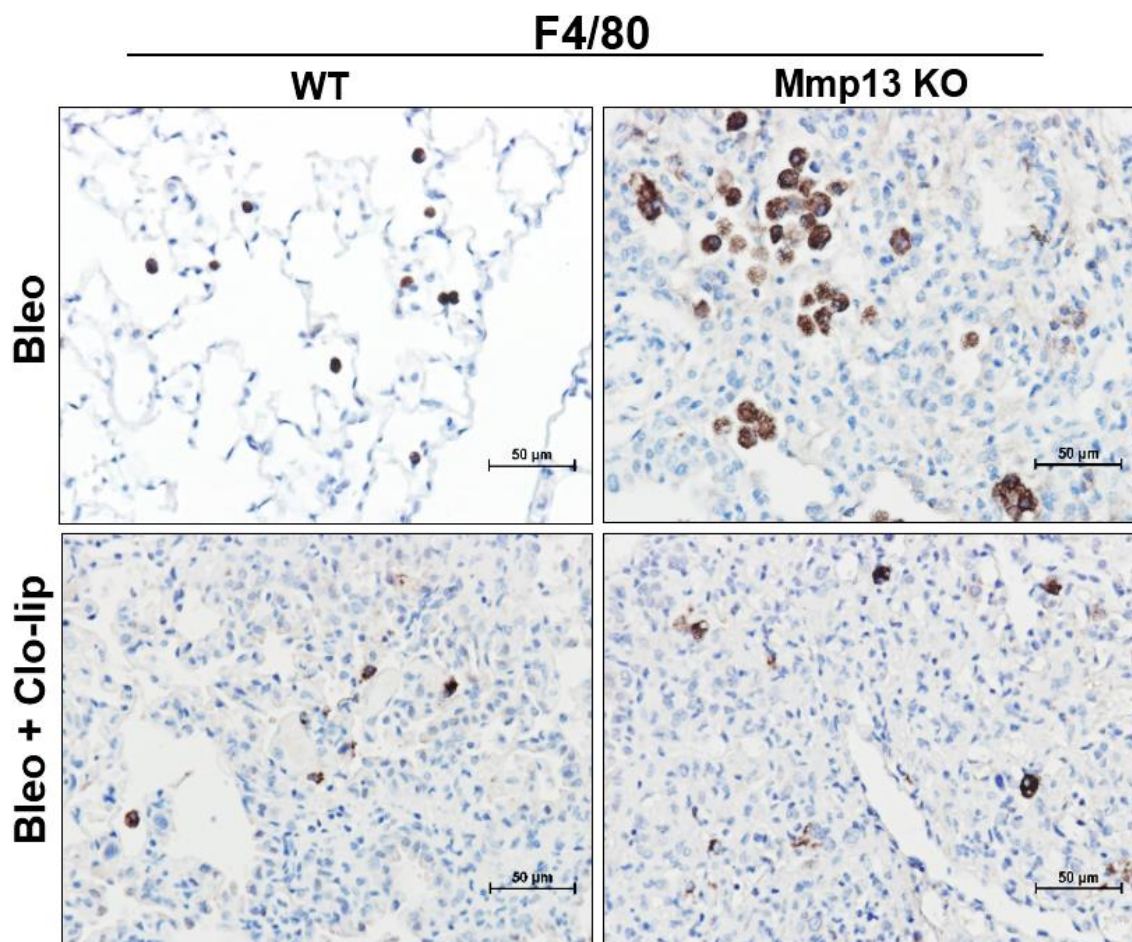


Figura 29. Localización del marcador de macrófagos F4/80 post-administración de Clo-lip en ratones tratados con bleomicina. Fotomicrografías representativas de tinción inmunohistoquímica realizadas con anticuerpos específicos contra el marcador de macrófagos F4/80. Se observa una disminución de células positivas en los grupos (WT y Mmp13 KO) tratados con Bleo + Clo-lip. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina y las imágenes fueron tomadas a un aumento original de 40X (barras de escala, 50 µm)

De igual forma se realizó una inmunohistoquímica contra Ym1, una enzima que se ve sobreexpresada en modelos murinos de fibrosis pulmonar (Mora *et al.*, 2006) y uno de los principales marcadores de macrófagos M2 o activados alternativamente, población que se ha demostrado aumenta durante la etapa fibrosis en el modelo de bleomicina Gibbons *et al.* (2011) y que, además se sugiere tiene un papel prófibrótico en modelos de fibrosis pulmonar inducidos por bleomicina o por agentes virales como el herpesvirus (Mora *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2014).

La administración de clodronato, causó una disminución en el número de células Ym1 positivas en el pulmón de ratones en ambos genotipos (**Figura 30**) Sin embargo, aunque se elimina esta supuesta población profibrótica se observa un retraso en la resolución en los ratones tratados con bleomicina + clodronato. Nuestros hallazgos son similares a las observaciones obtenidas por Gibbons *et al.* (2011), donde mostraron que al administrar clodronato durante la fase de fibrosis disminuyen las células positivas al marcador Ym1 así como el grado de fibrosis, sin embargo, en su estudio no se evaluó la expresión de Ym1 en los macrófagos durante la resolución.

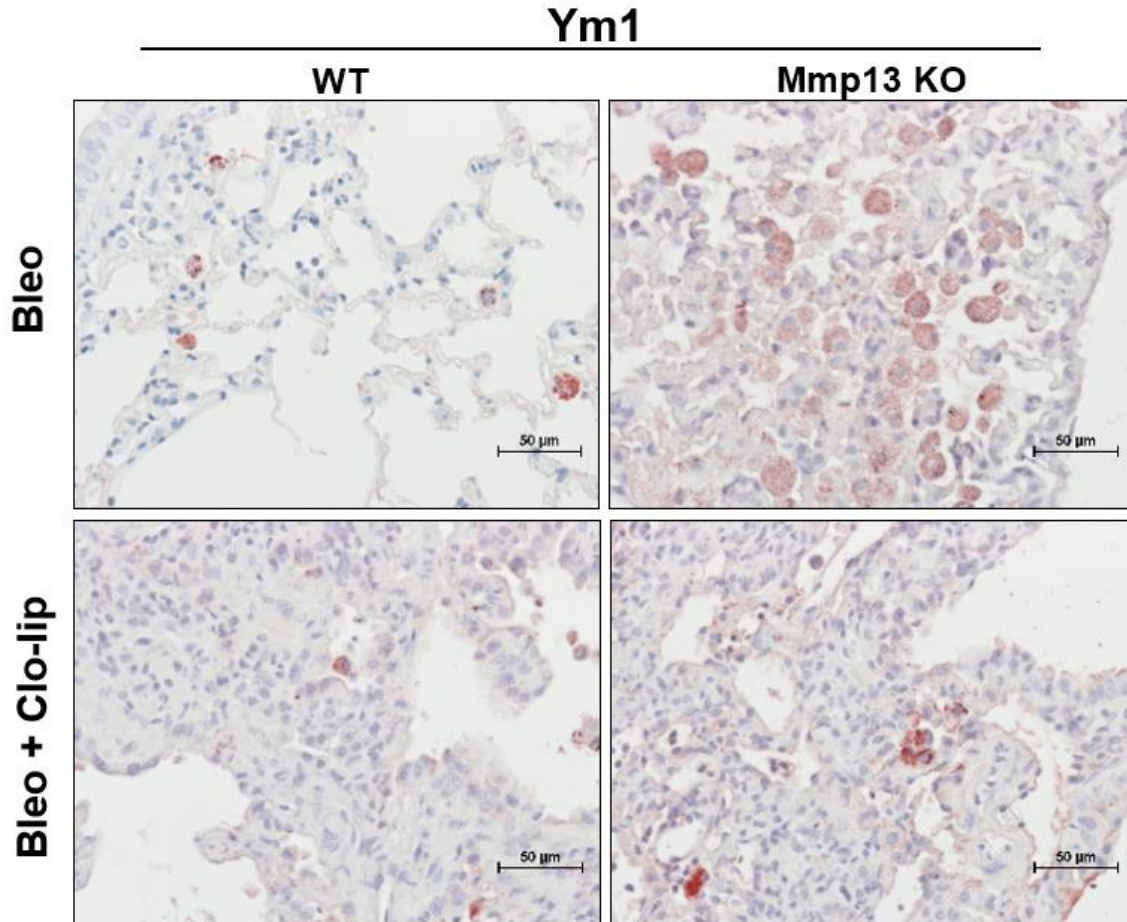


Figura 30. Localización celular de marcador de macrófagos alternativamente activados (Ym1), postadministración de Clo-lip en ratones tratados con bleomicina. Fotomicrografías representativas de tinción inmunohistoquímica realizadas con anticuerpos específicos contra Ym1. Se observa una disminución de células positivas (WT y Mmp13 KO) tratados con Bleo + Clo-lip. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina y las imágenes fueron tomadas a un aumento original de 40X (barras de escala, 50 μ m)

Para confirmar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, que muestran una disminución en las células positivas para los marcadores F4/80 y YM1, se evaluó su expresión a nivel de proteína por inmunoblot. Observamos de igual forma que el nivel de proteína de dichos marcadores se encuentra disminuido significativamente en el sobrenadante de extracto pulmonar en los grupos tratados con bleomicina + clodronato con respecto a los tratados con solo con bleomicina en ambos genotipos (**Figura 31 A-B**). En conjunto estos resultados demuestran que nuestro modelo de eliminación de macrófagos es efectivo.

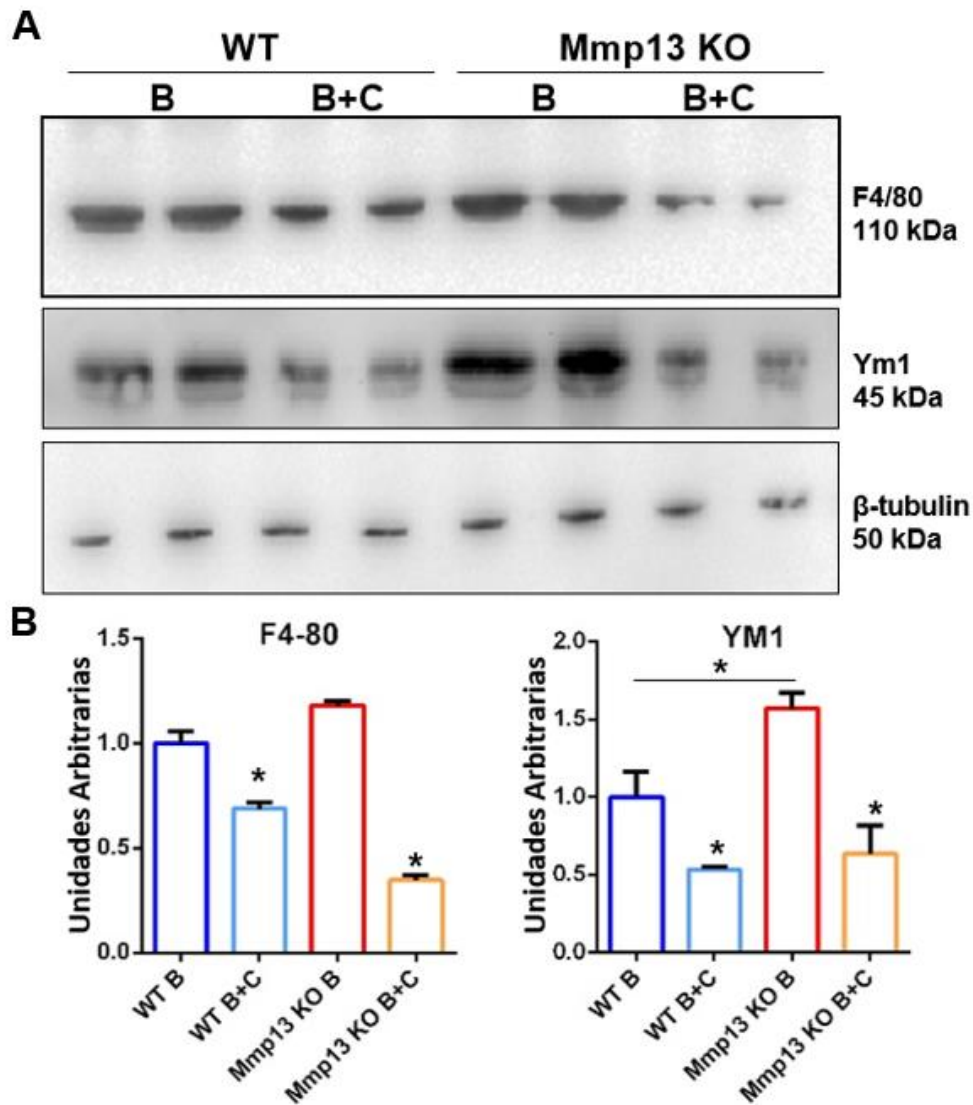


Figura 31. Expresión de F4/80 y Ym1 evaluada por *immunoblot* después de la administración con clodronato en ratones tratados con bleomicina. A. *Immunoblot* representativo que muestra la expresión F4/80 y Ym1 en el tejido pulmonar de ratones WT y Mmp13 KO a los 56 días postinstilación (n=3 ratones/grupo) se observa una disminución en la expresión de los ratones tratados con Bleo + Clo-lip con respecto a los tratados con bleomicina, β -actina fue utilizada como control de carga. B. Las gráficas de barras muestran el análisis densitométrico y representan una media \pm DE. La significancia estadística fue determinada por una ANOVA de dos vías ($p < 0.05$).

La eliminación de los macrófagos pulmonares, durante la etapa de resolución, favorece la persistencia del daño y fibrosis.

Mientras que en los ratones WT tratados únicamente con bleomicina se observa una recuperación de la arquitectura pulmonar casi completa a los 56 días, que se traduce en un proceso de resolución de la fibrosis pulmonar (**Figura 32 A**). La eliminación de los macrófagos resulta en un retardo en la resolución y una persistencia del daño observada como grandes acumulaciones de colágena en el pulmón, además de un incremento en la infiltración de linfocitos (**Figura 26 C**). Nosotros reportamos previamente que la enzima MMP13 es principalmente expresada en los macrófagos durante la etapa de resolución (Cabrera *et al.*, 2019 en prensa). Además, demostramos que la deficiencia de la enzima MMP13 en el ratón genéticamente modificado *Mmp13* KO, conduce a un retraso en la resolución de la fibrosis al compararlo con el ratón silvestre (Cabrera *et al.*, 2019 en prensa).

Los ratones WT tratados con bleomicina + clodronato, fueron incapaces de resolver la fibrosis a los 56 días. En la tinción de Masson, observamos el depósito de colágena en zonas extensas en ratones tratados con bleomicina + clodronato, mientras que en el ratón tratado solo con bleomicina, observamos colágena solo alrededor de los bronquios y los vasos sanguíneos, pero no en el parénquima. Estos datos indican que la eliminación de los macrófagos con clodronato, durante la fibrosis, retrasa su resolución, y el ratón WT, bajo estas condiciones, imita el fenotipo del ratón *Mmp13* KO. Dado que el ratón *Mmp13* KO presenta *per se* un fenotipo de resolución anormal, no se encontraron diferencias significativas entre los KO tratados solo con bleomicina y los KO tratados con bleomicina + clodronato.

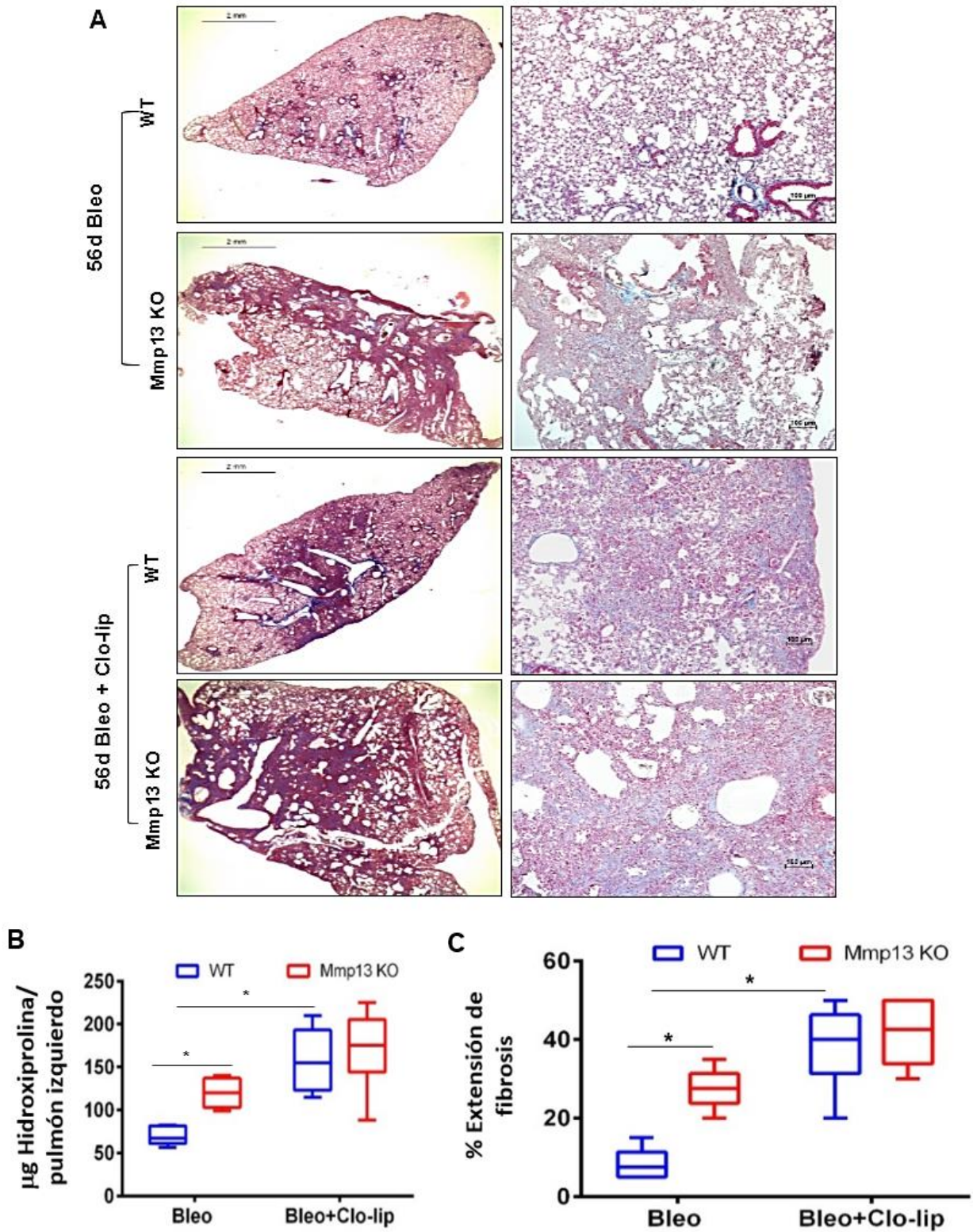


Figura 32. Efecto de la eliminación de macrófagos durante la resolución de la fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina. A. Imágenes representativas de microscopía estereoscópica y de luz de secciones de tejido pulmonar teñidos con la técnica de Masson de ratones WT y Mmp13 KO a los 56 días postinstilación de

bleomicina o bleomicina + Clo-lip. Se muestra una persistencia de daño en los ratones tratados con bleo + clo-lip caracterizado por una acumulación de colágena teñida en azul claro. B. Se muestra el contenido de hidroxiprolina en tejido pulmonar a los 56 días postinstilación con bleomicina de ratones WT y Mmp13 KO con los dos tratamientos. C. Se muestra el porcentaje de la extensión de la fibrosis pulmonar. Los datos son presentados como gráficas de ajas y bigotes con las barras horizontales representando la media \pm DE. La significancia estadística fue determinada por una ANOVA de dos vías ($p < 0.05$).

La concentración de hidroxiprolina, así como la extensión de fibrosis es significativamente mayor en los ratones WT tratados con bleomicina + clodronato, en comparación con los ratones WT tratados solo con bleomicina. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de hidroxiprolina, ni en la extensión de fibrosis entre los KO tratados solo con bleomicina y los KO tratados con bleomicina + clodronato, debido a que, como se mencionó previamente, los Mmp13 KO presentan un fenotipo de retraso en la resolución.

Estos resultados corroboran la evidencia mostrada anteriormente (Gibbons *et al.*, 2011), e indican que los macrófagos y sus enzimas de degradación de la MEC, por ejemplo, MMPs como las colagenasas (MMP8 y MMP13) y las gelatinasas (MMP2 y MMP9) desempeñan una función crítica en la resolución de la fibrosis pulmonar.

Localización celular de la MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar postadministración de clodronato.

Con el fin de determinar si la eliminación de los macrófagos efectivamente reduce el número de células MMP13 positivas, se realizó una inmunohistoquímica a 42 y 56 días postinstilación de bleomicina y después del tratamiento con clodronato. Los resultados obtenidos demuestran que la administración de clodronato efectivamente reduce el número de macrófagos MMP13 positivos en el pulmón de los ratones WT a los 42 y 56 días (**Figura 33 B**). Además, no se localizó la MMP13 en otro tipo celular, rechazando la hipótesis de que otros tipos celulares pudieran compensar su deficiencia por la eliminación de los macrófagos pulmonares.

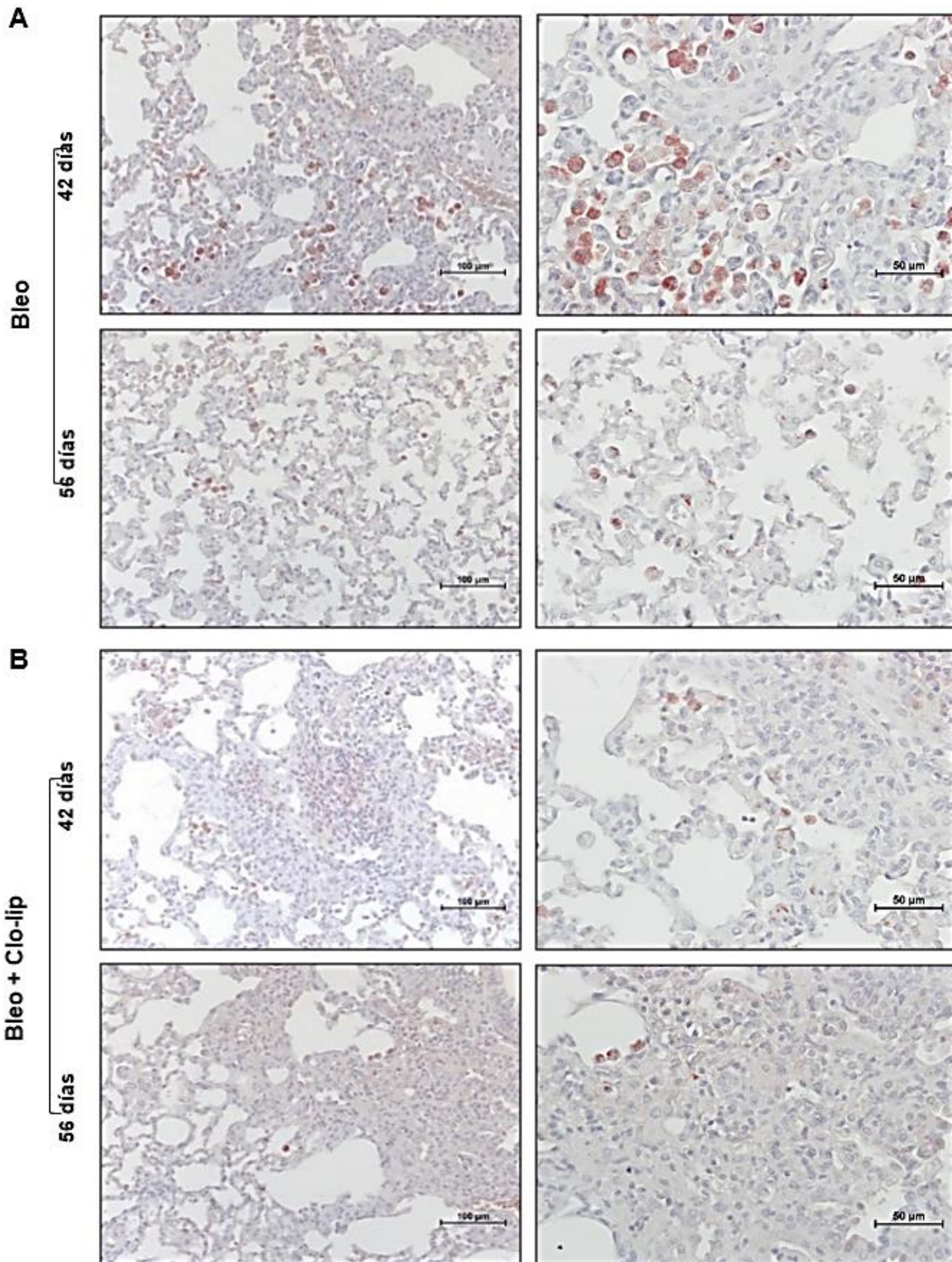


Figura 33. La administración de Clo-lip reduce los macrófagos MMP13 positivos. Fotomicrografías representativas de la tinción inmunohistoquímica realizada con anticuerpos específicos contra MMP13 en secciones de tejido pulmonar de ratones WT a los 42 y 56 días del tratamiento Bleomicina (A) o Bleomicina +

Clo-lip (B). Se observa un número reducido de células MMP13 positivas en los ratones tratados con Bleo+Clo-lip.

Evaluación de la actividad colagenolítica en el tejido pulmonar.

Con el fin de evaluar si efectivamente disminuye la actividad de la colagenasa 3 debido a la eliminación de los macrófagos se realizó un ensayo de actividad de la MMP13 y un ensayo de degradación de colágena tipo I acoplada con FITC. En estos ensayos un aumento de la fluorescencia detectada es proporcional al aumento de la actividad colagenolítica, particularmente de la MMP13 (**Figura 34 B**) y la actividad total o global (**Figura 34 A**). En ambos ensayos se observa una disminución significativa de la actividad tanto de MMP13, como en la actividad colagenolítica total por efecto de la eliminación de los macrófagos en los grupos tratados con bleomicina + clodronato en comparación con el grupo tratado solo con bleomicina, tanto en los WT, como en los Mmp13 KO. Lo anterior sugiere una contribución crítica de la colagenasa 3 en la actividad colagenolítica total y coincide con los niveles bajos de la proteína detectados por inmunohistoquímica.

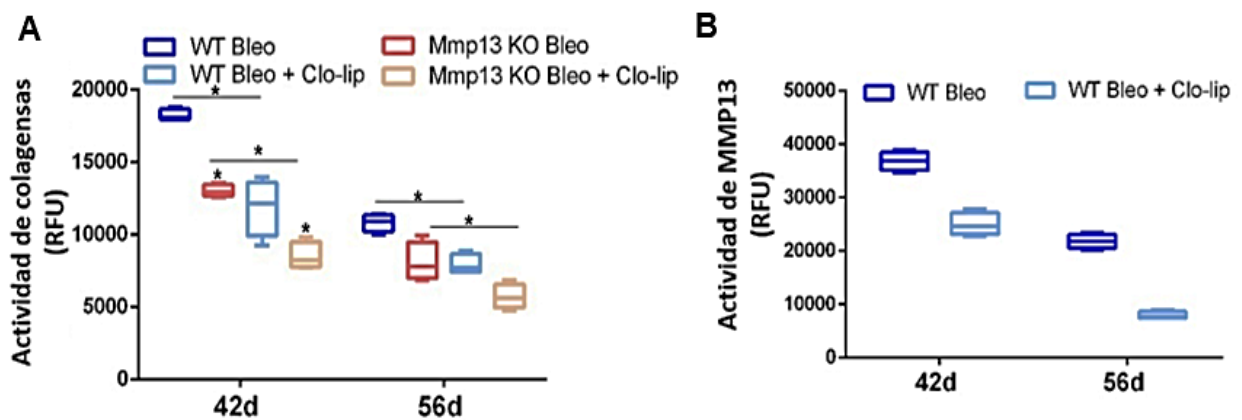


Figura 34. La eliminación de los macrófagos disminuye la actividad colagenolítica durante la resolución de la fibrosis pulmonar. A. Actividad de las colagenasas en unidades de fluorescencia relativa (RFU) determinado en extracto celular. B. Actividad de la MMP13 en unidades de fluorescencia relativa (RFU) determinado en extracto celular. Los datos son presentados como gráficas de ajas y bigotes con las barras horizontales representando la media \pm DE. La significancia estadística fue determinada por una ANOVA de dos vías ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Papel de la MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar.

Las MMPs son de vital importancia en el metabolismo de la MEC, son las principales enzimas involucradas en la degradación y remodelación de esta red de proteínas, y colectivamente degradan todos los componentes de la misma (Bonnans *et al.*, 2014). En FPI, en donde la acumulación de la MEC es una marca características, las MMP regulan la progresión de la enfermedad por una gran variedad de mecanismos, que implican no solo su actividad proteolítica sobre moléculas de la MEC como la colágena o la fibronectina (Giannandrea y Parks, 2014). Estudios en modelo murinos han demostrado que las MMP también cumplen funciones a favor de un proceso profibrótico, incrementando los niveles pulmonares o la actividad de mediadores profibróticos como TGF- β 1 o reduciendo los niveles pulmonares de mediadores antifibróticos como TNF- α , promoviendo la migración anormal de las células epiteliales, induciendo el cambio del fenotipo de los macrófagos pulmonares de un fenotipo M1 a uno M2 y promoviendo la migración de los fibrocitos (revisado en Craig *et al.*, 2015). De hecho, los niveles de expresión de las MMP se encuentran alterados en pacientes con FPI comparados con pacientes normales tanto en el tejido pulmonar como en sangre (revisado en Craig *et al.*, 2015). Particularmente, un estudio reciente mostró que los niveles de expresión de la MMP13 se encuentran elevados en biopsias pulmonares de pacientes con FPI con respecto a pacientes normales (Nkyimbeng *et al.*, 2013), lo que sugiere un papel de esta colagenasa en la fibrosis pulmonar.

Nosotros evaluamos los niveles de expresión la MMP13 en el modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina, el cual se ha caracterizado y empleado ampliamente en el estudio de esta patología (Cabrera, 2006). Observamos un incremento en la expresión de la MMP13 a nivel de mRNA y proteína, así como un incremento en su actividad a los 35 días postinstilación de bleomicina, niveles que decrecen progresivamente hasta los 56 días, el cual es el periodo que abarca la etapa de resolución de la fibrosis. En principio, esto sugiere que la MMP13 participa durante el proceso de remodelación y degradación de la MEC,

necesario para la resolución de la fibrosis normal. En concordancia con dicha hipótesis, Fallowfield et al. (2007), empleando un modelo de fibrosis hepática inducida por CCl₄ observaron un incremento en la expresión de la MMP13 durante la resolución y sumado a esto, observaron que ratones deficientes de *Mmp13* presentaban un retraso en la resolución de la fibrosis comparados con los silvestres aun cuando el grado de fibrosis entre estos dos grupos no presentó diferencias significativas, por lo que en este modelo la MMP13 tiene una función principalmente durante la resolución (Fallowfield *et al.*, 2007).

Con la finalidad de clarificar el papel de la MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar utilizamos un ratón deficiente de *Mmp13* en nuestro modelo de bleomicina. De manera similar a lo demostrado en el modelo de fibrosis hepática, nosotros observamos un retraso en la resolución de la fibrosis pulmonar en los ratones *Mmp13* KO en comparación con los silvestres. Mientras que en el ratón silvestre no observamos focos de fibrosis a los 56 días, en el ratón *Mmp13* KO los focos de fibrosis persisten hasta el día 56, y sumado a esto el grado de fibrosis en los ratones *Mmp13* KO fue significativamente mayor que en los silvestres. En conjunto estos resultados demuestran que la MMP13 desempeña una función que favorece la resolución de la fibrosis pulmonar en el modelo de bleomicina. Sin embargo, desconocemos si su deficiencia puede conllevar en última instancia a la muerte de los ratones o dicha si su función se ve compensada por la actividad de otras MMPs.

En roedores la remodelación de la colágena fibrilar, se ha atribuido ampliamente a la acción de MMP13, la colagenasa principal identificada en este orden (Balbín *et al.*, 2001). Sin embargo, en humanos la principal colagenasa es la MMP1, enzima que también presenta niveles de expresión incrementados en el pulmón de pacientes con FPI y que no se encuentra en ratones (Nkyimbeng *et al.*, 2013). Esta diferencia entre especies dificulta hacer aproximaciones entre los modelos murinos y la enfermedad en humanos, sin embargo, nuestros resultados muestran evidencia contundente del papel proresolutivo de la MMP13 en la fibrosis pulmonar.

Para determinar el tipo o tipos celulares responsables de la producción de la MMP13 durante la resolución, realizamos una inmunohistoquímica contra MMP13. En biopsias pulmonares de pacientes con FPI, la localización de la MMP13 se ha encontrado principalmente en las células epiteliales bronquiolares y alveolares, así como en el

intersticio pulmonar (Nkyimbeng *et al.*, 2013). Por otro lado, en modelos murinos de fibrosis hepática se ha demostrado que los macrófagos son las principales células productoras de esta enzima durante la resolución de la fibrosis y, además, que la eliminación de estas células provoca tanto una disminución de los niveles de expresión de MMP13 como un retraso en la resolución ((Duffield *et al.*, 2013; Fallowfield *et al.*, 2007). Nosotros encontramos por inmunohistoquímica que los macrófagos también son los principales productores de MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar en el modelo de bleomicina. A los 35 días postinstilación de bleomicina se observa un incremento considerable de macrófagos positivos para MMP13, los cuales decrecen progresivamente hasta los 56 días, sin evidencia de otros tipos celulares positivos para esta enzima. Estos resultados aumentan la evidencia de que los macrófagos pueden tener un papel importante durante la resolución de la fibrosis.

Además de lo observado en los niveles de expresión de la MMP13 durante la resolución, también se observó un aumento significativo de su expresión durante la etapa inflamatoria. El papel de las MMP en la inflamación es un campo bastante explorado, se sabe que estas enzimas pueden regular la inflamación de distintas formas, a favor de un proceso inflamatorio: promoviendo la permeabilidad vascular para permitir la salida de células inflamatorias de los vasos sanguíneos y su entrada a los sitios de daño; activando mediadores proinflamatorios como citocinas, quimiocinas y proteínas accesorias que se unen, retienen o concentran las quimiocinas; promoviendo la migración de células inflamatorias como neutrófilos (Manicone y McGuire, 2008; Fingleton, 2017); o bien impidiendo la persistencia del proceso inflamatorio mediante la degradación de los mediadores proinflamatorios o bien mediante otros mecanismos como el control de la diferenciación de los macrófagos M2 antiinflamatorios (Manicone y McGuire, 2008; Fingleton, 2017).

Particularmente se ha observado *in vitro* que la MMP13 tiene la capacidad de procesar proteolíticamente quimiocinas como CXCL-12 la cual es un potente quimiotáctico para linfocitos y pierde la capacidad de unirse receptor después de ser procesada por la MMP13 (McQuibban *et al.*, 2001). Además, la MMP13 también puede procesar otras quimiocinas como CCL2, CCL, y CCL13 que al ser procesadas funcionan como antagonistas de su

receptor (McQuibban *et al.*, 2001). Estos estudios sugieren que la MMP13 puede tener una función antiinflamatoria mediante su capacidad para inactivar moléculas como quimiocinas. Evidencia que apoya a esta hipótesis demuestra que ratones deficientes e *Mmp13* instilados con bleomicina presentan una mayor inflamación con respecto a los ratones silvestres (Nkyimbeng *et al.*, 2013), por lo que en el modelo de bleomicina la MMP13 actúa como un importante mediador antiinflamatorio. Sin embargo, los tipos celulares encargados de su producción en esta etapa aún no han sido evaluados.

Cada vez es más claro el papel de la MMP13 como enzima antifibrótica en la resolución de la fibrosis pulmonar. Aunque son pocos los estudios que proveen evidencia al respecto, lo que remarca la importancia de este estudio, no existen estudios que sugieran un rol profibrótico de esta enzima o muestren resultados contradictorios, lo que si sucede con el estudio de su papel en la respuesta inflamatoria. Adicionalmente, autores proponen a CEBPB y RUNX2, dos factores de transcripción que inducen la actividad del promotor de la MMP13, como blancos de terapéuticos mediante la inducción de su expresión en células pulmonares (Craig *et al.*, 2015), lo cual requiere de mayor investigación en cuanto los tipos celulares encargados de la producción de la enzima y las vías involucradas en su producción y secreción.

Papel de los macrófagos durante la resolución de la fibrosis pulmonar.

Los macrófagos son las células inmunes más abundantes en el pulmón (aproximadamente el 70% de las células inmunes) y tienen una función sumamente importante en la remodelación de las vías aéreas durante la fibrosis pulmonar (Zhang *et al.*, 2018). De hecho, en respuesta a un daño provocado en el pulmón el número de macrófagos aumenta considerablemente (principalmente por el reclutamiento de monocitos provenientes de médula ósea) y estas células participan de manera crucial en los procesos que se desencadenan como consecuencia a dicho daño: inicialmente regulando la respuesta inflamatoria a través de la producción de citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias, y posteriormente también participan desencadenando y regulando el proceso fibrótico mediante la producción de una gran cantidad de mediadores moleculares como factores de crecimiento, citocinas, MMPs y otras moléculas de gran importancia en la fibrosis (*i. e.*

Arginasa1, Fizz1) (Wynn y Vanella, 2016). Todo este cuerpo de conocimiento se ha generado gracias a que, su papel en la fibrosis pulmonar en respuesta a distintos tipos de daño se ha estudiado extensivamente durante los últimos años (Byrne *et al.*, 2016). Sin embargo, existen muy pocos estudios hasta la fecha que aporten evidencia contundente sobre papel de los macrófagos en la resolución de la fibrosis pulmonar.

Con el fin de indagar sobre la función que desempeñan los macrófagos en la resolución de la fibrosis pulmonar, se utilizó un modelo de fibrosis inducida por bleomicina en combinación con un modelo de eliminación selectiva de macrófagos alveolares a través de la administración de clodronato contenido en liposomas empleado únicamente durante la etapa de la resolución que abarca desde la semana 5 en adelante. Gibbons *et al.* (2011) empleando el mismo modelo, demostró que la eliminación de los macrófagos produce un retraso en la resolución de la fibrosis pulmonar. En concordancia con dicho estudio, nosotros observamos que la eliminación de los macrófagos pulmonares durante la etapa resolutoria causa un retraso en la resolución y una persistencia del daño caracterizado por la deposición excesiva de matriz extracelular. De hecho, en ratones tratados únicamente con bleomicina, el tejido pulmonar alcanza una recuperación casi completa a los 56 días postinstilación, por el contrario, en ratones tratados con bleomicina + clodronato se observa una mayor cantidad de daño en el tejido y un mayor contenido de hidroxiprolina en el mismo en esta misma fecha, lo que se traduce en una persistencia del proceso fibrótico. Adicionalmente, nosotros observamos la disminución tanto de la expresión de Ym1 a nivel de proteína como de las células positivas a Ym1 después de la eliminación de los macrófagos durante la resolución de la fibrosis pulmonar.

Ym1 junto con Arginasa1 y Fizz1, son marcadores establecidos de macrófagos M2 (Mora *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2014). Aunque el concepto de macrófagos M1 y M2 se encuentra en discusión hasta la fecha, debido a que es derivado de experimentos *in vitro* y a que se sabe que los macrófagos pueden expresar tanto marcadores M1 como M2 los cuales no son excluyentes (Byrne *et al.*, 2016). Se sabe que durante el desarrollo y progresión de la fibrosis pulmonar, ocurre una infiltración predominante de macrófagos M2 en las áreas de fibrosis y estos actúan como reguladores vitales de la fibrogénesis (revisado en Zhang *et al.*, 2018). En relación a lo anterior mencionado, la expresión de Ym1 se ha visto elevada

en modelos crónicos de fibrosis pulmonar inducida por herpesvirus (Mora *et al.*, 2006) así como en el modelo de bleomicina (Gibbons *et al.*, 2011) durante la etapa de fibrosis. Además, se ha demostrado que la eliminación de los macrófagos durante la fibrosis en el modelo de bleomicina disminuye tanto la fibrosis pulmonar, como también la expresión de Ym1 (Gibbons *et al.*, 2011) y que marcadores como Arginasa1 y Fizz1 tienen un efecto prófibrótico (Liu *et al.*, 2014; Mora *et al.*, 2006) resultados que apoyan la hipótesis de que los macrófagos M2 son los principales reguladores de la fibrosis pulmonar. De manera interesante nosotros reportamos una disminución tanto de la expresión de Ym1 como de las células positivas a este marcador posterior a la eliminación de los macrófagos también durante la resolución de la fibrosis pulmonar, sin embargo, esto está asociado a un retraso en la resolución, hallazgo contradictorio al fenotipo profibrótico de los macrófagos Ym1+. Esto sugiere, más no ofrece evidencia contundente de un posible “switch” o cambio en el fenotipo y función de los macrófagos M2 de un fenotipo profibrótico a uno proresolutivo.

Estudios muestran evidencia de que la vía de Wnt, involucrada en la diferenciación celular, está asociada a la activación alternativa de los macrófagos (M2) y a regular el fenotipo proresolutivo de los macrófagos en modelos de fibrosis (Sennello *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2018). Particularmente se sabe que la vía canónica de Wnt/ β -catenina es importante para mantener la función profibrótica de los macrófagos y que induce la polarización a M2 (Redente *et al.*, 2017). Además, se encuentra sobreexpresada en pacientes con FPI (Selman *et al.*, 2006), y en modelos de fibrosis de piel tanto *in vivo* como *in vitro* se observó que TGF- β requiere de la activación de Wnt para inducir la fibrosis (Fernandez y Eickelberg, 2012).

En relación con la activación alternativa de los macrófagos y resolución de la fibrosis pulmonar, se sabe que la pérdida de la señalización de Wnt/ β -catenina en macrófagos Csf1r-Cre, β -catenina^{f/f} durante la fibrosis en un modelo murino de fibrosis renal está asociada con una disminución de marcadores M2 (Arginasa1 Ym1 y Fizz1) y una disminución de citocinas profibróticas como PDGF, VEGF, TGF- β 1 y CTGF (Feng *et al.*, 2018). Por el contrario, ratones deficientes de Lrp5, correceptor de la vía canónica de Wnt, a los cuales se les induce la fibrosis pulmonar por bleomicina presentan una reducción de la fibrosis, así como un incremento en la expresión de genes relacionados a la remodelación

de la MEC como MMP13 al día 14 (Sennello *et al.*, 2017), lo que favorece una rápida resolución de la fibrosis. Es probable que, estos mecanismos podrían estar involucrados en el cambio de la función profibrótica de los macrófagos M2 en nuestro estudio.

Por otro lado, con el fin de profundizar más sobre el papel de los macrófagos en la resolución y determinar si estos son la principal fuente de síntesis de la enzima MMP13, y a su vez las células responsables de la resolución de la fibrosis pulmonar, se evaluó si la eliminación de los macrófagos efectivamente produce un efecto significativo en la expresión de la MMP13 o si mecanismos compensatorios mantienen sus niveles durante la resolución. Los macrófagos son una importante fuente de MMPs y tienen la capacidad de influenciar el recambio de la MEC secretando MMPs o produciendo citocinas que promueven su producción en otros tipos celulares, además durante la fibrosis fagocitan directamente los componentes de la matriz extracelular y promueven la apoptosis de los miofibroblastos, mecanismos por los cuales promueven la resolución de la fibrosis (Duffield *et al.*, 2013). Sumado a esto, existen evidencias que demuestran un papel crítico de los macrófagos en la resolución de la fibrosis hepática en modelos murinos y de su papel como principales productores de MMP13 en este mismo modelo (Duffield *et al.*, 2005; Fallowfield *et al.*, 2007).

De manera similar a lo observado por Fallowfield *et al.* (2007) nosotros encontramos diferencias en el número de células positivas a MMP13 entre los ratones silvestres tratados con bleomicina y los tratados con bleomicina + clodronato. Mientras que en el primer grupo se observa un gran número de células positivas a los 42 días (macrófagos), en el segundo grupo, en donde se observó un retraso en la resolución de la fibrosis por efecto de la eliminación de los macrófagos, también se observó un menor número de células positivas para MMP13. Con el mismo propósito, evaluamos la actividad de la MMP13 y la actividad colagenolítica global o total en el tejido pulmonar y observamos una disminución de la actividad en los dos ensayos, lo que correlaciona con la disminución en el número de macrófagos y además sugiere que la actividad de la MMP13 no es compensada, al menos de manera total, por la acción de otras enzimas propuestas como proresolutivas como la MMP19 o la MMP10 (Craig *et al.*, 2015). En conjunto estos resultados sugieren que los macrófagos son los principales productores de MMP13 durante la resolución de la fibrosis

pulmonar, y que mediante este mecanismo promueven la remodelación de la MEC acumulada en el tejido pulmonar.

Finalmente, cómo se mencionó antes, se sabe que las dos poblaciones de macrófagos descritas en el pulmón, AM y IM participan en la fibrosis pulmonar (revisado en Byrne *et al.*, 2016), sin embargo, también se ha observado que la administración de clodronato no afecta la población de IM residentes cuando se administra por vía intratraqueal (Mathie *et al.*, 2015) como en nuestro estudio, ni cuando se administra de manera intravenosa (Sabatel *et al.*, 2017) posiblemente por su localización preferencial en el intersticio bronquial y en la cercanía de los vasos linfáticos (Gibbins *et al.*, 2017), lo que sugiere que el efecto observado en nuestro estudio es producto de la ausencia particular de los AM en el pulmón y que los IMs probablemente no estarían involucrados de manera importante en dichos efectos.

Papel de los macrófagos en la respuesta inflamatoria.

En nuestro estudio la eliminación de los macrófagos pulmonares produce un incremento en la respuesta inflamatoria caracterizado por niveles elevados de neutrófilos polimorfonucleares y linfocitos en BALF durante la etapa resolutive, esto es un fenómeno asociado al tratamiento con clodronato, ya que en la etapa de la resolución no se observan neutrófilos en el lavado pulmonar. Además, de manera interesante se observó el desarrollo de iBALT. El tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) es un tejido linfoide mucoso constitutivo adyacente a las vías aéreas superiores en algunas especies de mamíferos, incluyendo ratas y conejos, pero no se encuentra en humanos ni en ratones (Randall, 2010). Un tejido linfoide terciario denominado tejido linfoide asociado a bronquios inducible, es un tejido linfoide ectópico el cual se forma únicamente en respuesta a inflamación o infección en ratones y humanos y se puede observar en todo el tejido pulmonar (Randall, 2010).

El iBALT se conforma tanto de células B como células T, las cuales se encuentran arreglados estructuralmente en dos zonas: los folículos de células B y la zona de células T, de una manera que se asemeja a la organización de los órganos linfoides secundarios

convencionales (Hwang *et al.*, 2016). La zona de células T rodea a los folículos de células B y contiene células T CD4 y CD8, así como células dendríticas (Hwang *et al.*, 2016). En este contexto se ha observado que la administración de células dendríticas de médula ósea en el pulmón, las cuales contienen una fracción de macrófagos, inducen la formación de iBALT, lo que sugiere que los macrófagos están involucrados en la formación de este tejido linfoide, sin embargo, aún no se conocen los mecanismos (Hwang *et al.*, 2016).

En contradicción a la hipótesis anterior, nosotros encontramos que la eliminación de los macrófagos aun en ausencia de daño previo al tejido pulmonar, induce la formación de iBALT, lo que sugiere que los macrófagos pueden regular este tejido linfoide mediante distintos mecanismos, ya sea que tengan un efecto supresor y su ausencia promueva el mantenimiento del iBALT, o bien pueden favorecer su desarrollo mediante moléculas liberadas al sufrir apoptosis. En apoyo a esta última hipótesis, se ha observado que posterior a la instilación de material particulado como sales de aluminio y silica en el pulmón de ratones, se induce la muerte de los macrófagos los cuales liberan IL-1a (Kuroda *et al.*, 2016). La IL-1a promueve la migración de células dendríticas al tejido pulmonar y el desarrollo de células T asociadas a los folículos de células B induciendo así la formación de iBALT en el pulmón y promoviendo la inflamación (Kuroda *et al.*, 2016), mecanismo que podría estar involucrado en nuestro modelo de eliminación de macrófagos por clodronato. En última instancia nuestros resultados ofrecen evidencia de que la eliminación de los macrófagos tiene efectos sobre el número de células inmunes en el tejido pulmonar, contradictorio a lo reportado por otros autores que han observado que la eliminación de los macrófagos mediante la administración de clodronato tiene un efecto en la reducción de los macrófagos pulmonares, pero no así en el número de otras células inmunes (Thepen *et al.*, 1989).

En cuanto al papel de los macrófagos en la inflamación en modelos de fibrosis independientemente de la formación de tejido linfoide terciario, se ha observado que la eliminación de los macrófagos y los monocitos, durante la resolución de la fibrosis pulmonar inducida por IL-13 causa una disminución significativa de la inflamación, así como de la expresión de genes asociados a células Th2 en el tejido, lo que sugiere que los macrófagos tiene una función crítica en el mantenimiento de la inflamación tipo 2, la cual

se da preferencialmente en el modelo inducido por IL-13 (Borthwick *et al.*, 2016). De manera contradictoria a estos resultados, nosotros observamos que la eliminación de los macrófagos produce un incremento en la infiltración de neutrófilos y linfocitos y la formación de iBALT, lo que se traduce en un aumento en la respuesta inflamatoria derivada de la eliminación de los macrófagos. Sin embargo, estos resultados contradictorios pueden deberse al tipo de respuesta inflamatoria inducida en los diferentes modelos, ya que en el modelo de bleomicina se ha reportado un aumento principalmente de linfocitos B en el tejido linfoide pulmonar (Zhu *et al.*, 1996)

En general se sabe que los macrófagos tienen un efecto regulatorio sobre la respuesta inmune en el pulmón, particularmente presentan una acción supresora sobre la activación de las células T y sobre la producción de anticuerpos de las células B (Thepen *et al.*, 1994). Estudios demuestran que las células T, extraídas de pulmones de ratones que sufrieron la eliminación de los macrófagos, tienen una capacidad proliferativa incrementada (Strickland *et al.*, 1993), esto apoya

Algunos autores muestran evidencia de los efectos tóxicos del clodronato sobre el tejido, contrario a lo demostrado en un principio en el desarrollo del modelo de eliminación mediante la administración de clo-lip (Feith *et al.*, 1997; Van Rooijen y Sanders, 1996). Esta hipótesis, podría explicar el aumento en la respuesta inflamatoria y la hiperplasia del BALT tanto en condiciones controles como en ratones tratados previamente con bleomicina, la toxicidad del clodronato provoca una respuesta inflamatoria mientras que esta no es regulada debido a la falta del efecto supresor de los macrófagos.

En conclusión, nuestro estudio presenta evidencias contundentes del importante papel de la enzima MMP13 durante el proceso de resolución de la fibrosis pulmonar y señala a los macrófagos como principales células productoras de esta colagenasa. Además, nuestros resultados amplían los hallazgos obtenidos previamente y demuestran que la población de macrófagos M2 se mantiene durante la resolución y puede llevar a cabo un cambio en su fenotipo profibrotico a un o proresolutivo. Sin embargo, proponer a alguno de estos dos componentes como posibles blancos terapéuticos requiere de mayor investigación y plantea un reto debido a que tienen distintas funciones a lo largo del modelo.

CONCLUSIONES.

- 1) La inducción de inflamación y fibrosis induce un aumento en la expresión de MMP13, observando 2 picos a los 7 y a los 35 días post-tratamiento.
- 2) La expresión de la enzima MMP13 es localizada principalmente en macrófagos durante la etapa inflamatorio y la etapa de resolución, aunque se identificaron algunas células positivas del epitelio alveolar y bronquial.
- 3) El clodronato elimina en un alto porcentaje la población de macrófagos alveolares F4/80+, YM1+.
- 4) La eliminación de los macrófagos alveolares con clodronato reduce el número de células positivas para MMP13 durante la resolución.
- 5) El ratón deficiente de la enzima MMP13 desarrolla una respuesta fibrosante exacerbada y muestras un retraso en la resolución.
- 6) La inducción de daño pulmonar en combinación con clodronato durante la etapa de resolución de la fibrosis incrementa la mortandad tanto en los ratones WT como en los Mmp13 KO.
- 7) La eliminación de los macrófagos durante la etapa resolutive provoca un retraso en la resolución de la fibrosis pulmonar mostrando una persistencia de daño hasta los 56 días.
- 8) El clodronato provoca una respuesta inflamatoria aumentada en ambos genotipos y esta respuesta se mantiene en ratones tratados previamente con bleomicina.
- 9) El clodronato tanto en los ratones control, como en los ratones tratados con bleomicina induce el desarrollo de BALT, en ambos genotipos.
- 10) Los macrófagos pulmonares participan activamente en la producción de MMP13 durante la resolución de la fibrosis pulmonar en el modelo de bleomicina y su eliminación provoca tanto una reducción en la actividad colagenolítica de la enzima en el tejido como una reducción de la actividad colagenolítica global.
- 11) Los macrófagos son actores fundamentales en el proceso de resolución de la fibrosis pulmonar y su eliminación provoca un retraso en la misma.

REFERENCIAS

- Atabai, K., Jame, S., Azhar, N., Kuo, A., Lam, M., McKleroy, W., ... & Wolters, P. (2009). Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages. *The Journal of clinical investigation*, 119(12), 3713-3722.
- Balbín, M., Fueyo, A., Knäuper, V., López, J. M., Alvarez, J., Sánchez, L. M., ... & López-Otín, C. (2001). Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 10253-10262.
- Bem, R. A., Farnand, A. W., Wong, V., Koski, A., Rosenfeld, M. E., van Rooijen, N., ... & Matute-Bello, G. (2008). Depletion of resident alveolar macrophages does not prevent Fas-mediated lung injury in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(2), L314-L325.
- Bode, W., & Maskos, K. (2003). Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biological chemistry*, 384(6), 863-872.
- Boe, D. M., Boule, L. A., & Kovacs, E. J. (2017). Innate immune responses in the ageing lung. *Clinical & Experimental Immunology*, 187(1), 16-25.
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(12), 786.
- Borthwick, L. A., Barron, L., Hart, K. M., Vannella, K. M., Thompson, R. W., Oland, S., ... & Wynn, T. A. (2016). Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis. *Mucosal immunology*, 9(1), 38.
- Burgstaller, G., Oehrle, B., Gerckens, M., White, E. S., Schiller, H. B., & Eickelberg, O. (2017). The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *European Respiratory Journal*, 50(1), 1601805.
- Byrne, A. J., Maher, T. M., & Lloyd, C. M. (2016). Pulmonary macrophages: a new therapeutic pathway in fibrosing lung disease? *Trends in molecular medicine*, 22(4), 303-316.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., & Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Molecular and cellular biochemistry*, 253(1-2), 269-285.

- Craig, V. J., Zhang, L., Hagood, J. S., & Owen, C. A. (2015). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 53(5), 585-600.
- Drake, M. T., Clarke, B. L., & Khosla, S. (2008, September). Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 83, No. 9, pp. 1032-1045). Elsevier.
- Duffield, J. S., Forbes, S. J., Constandinou, C. M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., ... & Iredale, J. P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *The Journal of clinical investigation*, 115(1), 56-65.
- Duffield, J. S., Lupher, M., Thannickal, V. J., & Wynn, T. A. (2013). Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8, 241-276.
- Elder, A. C. P., Gelein, R., Oberdörster, G., Finkelstein, J., Notter, R., & Wang, Z. (2004). Efficient depletion of alveolar macrophages using intratracheally inhaled aerosols of liposome-encapsulated clodronate. *Experimental lung research*, 30(2), 105-120.
- Fallowfield, J. A., Mizuno, M., Kendall, T. J., Constandinou, C. M., Benyon, R. C., Duffield, J. S., & Iredale, J. P. (2007). Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *The Journal of Immunology*, 178(8), 5288-5295.
- Feith, G. W., Bogman, M. J., Assmann, K. J., Schalkwijk, J., & Koene, R. A. (1997). Decreased PMN accumulation and glomerular damage by clodronate liposome treatment in PMN-dependent anti-GBM nephritis in mice. *Experimental nephrology*, 5(4), 301-304.
- Feng, Y., Ren, J., Gui, Y., Wei, W., Shu, B., Lu, Q., ... & Dai, C. (2018). Wnt/ β -catenin-promoted macrophage alternative activation contributes to kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(1), 182-193.
- Fernandez, I. E., & Eickelberg, O. (2012). The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 111-116.
- Fingleton, B. (2017). Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1864(11), 2036-2042.
- Flehsig, P., Hartenstein, B., Teurich, S., Dadrich, M., Hauser, K., Abdollahi, A., ... & Huber, P. E. (2010). Loss of matrix metalloproteinase-13 attenuates murine

- radiation-induced pulmonary fibrosis. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 77(2), 582-590.
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123(24), 4195-4200.
- Frediani, B., & Bertoldi, I. (2015). Clodronate: new directions of use. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 12(2), 97.
- Freije, J. M., Diez-Itza, I., Balbín, M., Sánchez, L. M., Blasco, R., Tolivia, J., & López-Otín, C. (1994). Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *Journal of Biological Chemistry*, 269(24), 16766-16773.
- Gaffney, J., Solomonov, I., Zehorai, E., & Sagi, I. (2015). Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biology*, 44, 191-199.
- Galea, C. A., Nguyen, H. M., Chandy, K. G., Smith, B. J., & Norton, R. S. (2014). Domain structure and function of matrix metalloprotease 23 (MMP23): role in potassium channel trafficking. *Cellular and molecular life sciences*, 71(7), 1191-1210.
- Giannandrea, M., & Parks, W. C. (2014). Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease models & mechanisms*, 7(2), 193-203.
- Gibbings, S. L., Thomas, S. M., Atif, S. M., McCubbrey, A. L., Desch, A. N., Danhorn, T., ... & Jakubzick, C. V. (2017). Three unique interstitial macrophages in the murine lung at steady state. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 57(1), 66-76.
- Gibbons, M. A., MacKinnon, A. C., Ramachandran, P., Dhaliwal, K., Duffin, R., Phythian-Adams, A. T., ... & Hirani, N. (2011). Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184(5), 569-581.
- Glasser, S. W., Hagood, J. S., Wong, S., Taype, C. A., Madala, S. K., & Hardie, W. D. (2016). Mechanisms of lung fibrosis resolution. *The American journal of pathology*, 186(5), 1066-1077.
- Gordon, S., Plüddemann, A., & Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological reviews*, 262(1), 36-55.
- Gordon, S., & Martinez-Pomares, L. (2017). Physiological roles of macrophages. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 469(3-4), 365-374.

- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., ... & Greter, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, *38*(4), 792-804.
- Hwang, J. Y., Randall, T. D., & Silva-Sanchez, A. (2016). Inducible bronchus-associated lymphoid tissue: taming inflammation in the lung. *Frontiers in immunology*, *7*, 258.
- Inada, M., Wang, Y., Byrne, M. H., Rahman, M. U., Miyaura, C., López-Otín, C., & Krane, S. M. (2004). Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(49), 17192-17197.
- King Jr, T. E., Pardo, A., & Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*, *378*(9807), 1949-1961.
- Kuroda, E., Ozasa, K., Temizoz, B., Ohata, K., Koo, C. X., Kanuma, T., ... & Nakajima, S. (2016). Inhaled fine particles induce alveolar macrophage death and interleukin-1 α release to promote inducible bronchus-associated lymphoid tissue formation. *Immunity*, *45*(6), 1299-1310.
- Leeman, M. F., Curran, S., & Murray, G. I. (2002). The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *37*(3), 149-166.
- Lehenkari, P. P., Kellinsalmi, M., Näpänkangas, J. P., Ylitalo, K. V., Mönkkönen, J., Rogers, M. J., ... & Hassinen, I. E. (2002). Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing.
- Liu, T., Yu, H., Ullenbruch, M., Jin, H., Ito, T., Wu, Z., ... & Phan, S. H. (2014). The in vivo fibrotic role of FIZZ1 in pulmonary fibrosis. *PloS one*, *9*(2), e88362.
- Machiels, B., Dourcy, M., Xiao, X., Javaux, J., Mesnil, C., Sabatel, C., ... & Guillemins, M. (2017). A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nature immunology*, *18*(12), 1310.
- Madala, S. K., Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Wilson, M. S., Minnicozzi, S., Cheever, A. W., ... & Wynn, T. A. (2010). Matrix metalloproteinase 12-deficiency augments extracellular matrix degrading metalloproteinases and attenuates IL-13-dependent fibrosis. *The Journal of Immunology*, *184*(7), 3955-3963.

- Manicone, A. M., & McGuire, J. K. (2008, February). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 1, pp. 34-41). Academic Press.
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*, 6.
- Mathie, S. A., Dixon, K. L., Walker, S. A., Tyrrell, V., Mondhe, M., O'Donnell, V. B., ... & Lloyd, C. M. (2015). Alveolar macrophages are sentinels of murine pulmonary homeostasis following inhaled antigen challenge. *Allergy*, 70(1), 80-89.
- McQuibban, G. A., Butler, G. S., Gong, J. H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I., & Overall, C. M. (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43503-43508.
- McQuibban, G. A., Gong, J. H., Wong, J. P., Wallace, J. L., Clark-Lewis, I., & Overall, C. M. (2002). Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood*, 100(4), 1160-1167.
- Misharin, A. V., Morales-Nebreda, L., Reyfman, P. A., Cuda, C. M., Walter, J. M., McQuattie-Pimentel, A. C., ... & Abdala-Valencia, H. (2017). Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *Journal of Experimental Medicine*, 214(8), 2387-2404.
- Moore, B. B., Paine, R., Christensen, P. J., Moore, T. A., Sitterding, S., Ngan, R., ... & Toews, G. B. (2001). Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4368-4377.
- Mora, A. L., Torres-González, E., Rojas, M., Corredor, C., Ritzenthaler, J., Xu, J., ... & Stecenko, A. (2006). Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 35(4), 466-473.
- Mouratis, M. A., & Aidinis, V. (2011). Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current opinion in pulmonary medicine*, 17(5), 355-361.
- Mouw, J. K., Ou, G., & Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(12), 771.
- Murray, L. A., Chen, Q., Kramer, M. S., Hesson, D. P., Argentieri, R. L., Peng, X., ... & Elias, J. A. (2011). TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(1), 154-162.

- Nkyimbeng, T., Ruppert, C., Shiomi, T., Dahal, B., Lang, G., Seeger, W., ... & Günther, A. (2013). Pivotal role of matrix metalloproteinase 13 in extracellular matrix turnover in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*, 8(9), e73279.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(3), 221.
- Pardo, A., & Selman, M. (2002). Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci*, 7(1), 1743-1761.
- Pardo, A., & Selman, M. (2006). Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 383-388.
- Pardo, A., Cabrera, S., Maldonado, M., & Selman, M. (2016). Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research*, 17(1), 23.
- Parks, W. C., & Shapiro, S. D. (2000). Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respiratory research*, 2(1), 3.
- Passalacqua, G., Mincarini, M., Colombo, D., Troisi, G., Ferrari, M., Bagnasco, D., ... & Canonica, G. W. (2017). IL-13 and idiopathic pulmonary fibrosis: possible links and new therapeutic strategies. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 45, 95-100.
- Randall, T. D. (2010). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT): structure and function. In *Advances in immunology* (Vol. 107, pp. 187-241). Academic Press.
- Redente, E. F. (2017). Macrophages and fibrosis resolution. harnessing Wnt/ β -catenin signaling as the way and the means.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins, 230-236.
- Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., ... & Quatresooz, P. (2017). Exposure to bacterial CpG DNA protects from airway allergic inflammation by expanding regulatory lung interstitial macrophages. *Immunity*, 46(3), 457-473.
- Schyns, J., Bureau, F., & Marichal, T. (2018). Lung interstitial macrophages: past, present, and future. *Journal of immunology research*, 2018.
- Selman, M., & Pardo, A. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory research*, 3(1), 3.
- Selman, M., Pardo, A., Barrera, L., Estrada, A., Watson, S. R., Wilson, K., ... & Zlotnik, A. (2006). Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from

- hypersensitivity pneumonitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 173(2), 188-198.
- Sen, A. I., Shiomi, T., Okada, Y., & D'Armiento, J. M. (2010). Deficiency of matrix metalloproteinase-13 increases inflammation after acute lung injury. *Experimental lung research*, 36(10), 615-624.
- Sennello, J. A., Misharin, A. V., Flozak, A. S., Berdnikovs, S., Cheres, P., Varga, J., ... & Lam, A. P. (2017). Lrp5/ β -catenin signaling controls lung macrophage differentiation and inhibits resolution of fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 56(2), 191-201.
- Sgalla, G., Iovene, B., Calvello, M., Ori, M., Varone, F., & Richeldi, L. (2018). Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respiratory research*, 19(1), 32.
- Sieweke, M. H., & Allen, J. E. (2013). Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science*, 342(6161), 1242974.
- Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(4), 448-464.
- Strickland, D. H., Thepen, T., Kees, U. R., Kraal, G., & Holt, P. G. (1993). Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages. *Immunology*, 80(2), 266.
- Tardif, G., Reboul, P., Pelletier, J. P., & Martel-Pelletier, J. (2004). Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Modern Rheumatology*, 14(3), 197-204.
- Thepen, T., Van Rooijen, N., & Kraal, G. (1989). Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 170(2), 499-509. *metabolite. Molecular pharmacology*, 61(5), 1255-1262.
- Thepen, T., Kraal, G., & Holt, P. G. (1994). The role of alveolar macrophages in regulation of lung inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 725(1), 200-206.
- Tomos, I. P., Tzouveleakis, A., Aidinis, V., Manali, E. D., Bouros, E., Bouros, D., & Papisiris, S. A. (2017). Extracellular matrix remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis. It is the 'bed' that counts and not 'the sleepers'. *Expert review of respiratory medicine*, 11(4), 299-309.

- Van Rooijen, N., & Van Nieuwmegen, R. (1984). Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell and tissue research*, 238(2), 355-358.
- Van Rooijen, N. T. (1989). The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *Journal of immunological methods*, 124(1), 1-6.
- Van Rooijen, N. I. C. O., & Sanders, A. (1996). Kupffer cell depletion by liposome-delivered drugs: comparative activity of intracellular clodronate, propamidine, and ethylenediaminetetraacetic acid. *Hepatology*, 23(5), 1239-1243.
- Westphalen, K., Gusarova, G. A., Islam, M. N., Subramanian, M., Cohen, T. S., Prince, A. S., & Bhattacharya, J. (2014). Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature*, 506(7489), 503.
- White, E. S. (2015). Lung extracellular matrix and fibroblast function. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(Supplement 1), S30-S33.
- Wynn, T. A., & Barron, L. (2010, August). Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. In *Seminars in liver disease* (Vol. 30, No. 3, p. 245). NIH Public Access.
- Wynn, T. A., & Vannella, K. M. (2016). Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*, 44(3), 450-462.
- Zasłona, Z., Przybranowski, S., Wilke, C., van Rooijen, N., Teitz-Tennenbaum, S., Osterholzer, J. J., ... & Peters-Golden, M. (2014). Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. *The Journal of Immunology*, 193(8), 4245-4253.
- Zhang, L., Wang, Y., Wu, G., Xiong, W., Gu, W., & Wang, C. Y. (2018). Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respiratory research*, 19(1), 170.
- Zhou, X., & Moore, B. B. (2018). Location or origin? What is critical for macrophage propagation of lung fibrosis?
- Zhu, J., Kaplan, A. M., & Goud, S. N. (1996). Immunologic alterations in bleomycin-treated mice: role of pulmonary fibrosis in the modulation of immune responses. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 153(6), 1924-1930.