

0346
2eje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios de Posgrado

**"LOCALIZACION POR HIBRIDACION *IN SITU*
DE COLAGENASA Y TIMP EN EL GRANULO-
MA INDUCIDO POR CARRAGENINA"**

T E S I S

**Que para obtener el Grado Académico de
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)**

p r e s e n t a

JULIA PEREZ RAMOS

Directora de Tesis: Dra. Annie Pardo Semo

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la UNAM bajo la asesoría de la Dra. Annie Pardo Semo.

Con todo cariño a mi esposo.

A mis hijas Rosalinda y Sandra con amor.

A mis padres por su entrega y dedicación

A mis hermanos

A mis sobrinos

Agradecimientos

A la Dra. Annie Pardo por proporcionarme el interesante tema de investigación motivo de este trabajo y por sus importantes sugerencias durante el desarrollo del mismo.

Al Dr. Moisés Selman por sus valiosas y profesionales opiniones.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez-García por sus inapreciables sugerencias y por el apoyo técnico brindado para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Fernando Montiel quién metodológicamente aportó elementos para la consolidación del presente.

A la M. en C. María Cristina Fresán Orozco quién junto con su amistad me brindó tiempo y conocimientos que enriquecieron profundamente el contenido del presente trabajo.

A la Q:F:B. Alma Rosa Cortés Arroyo por su valiosa asesoría técnica

A la Bióloga Remedios Ramírez Rangel por su valiosa ayuda técnica.

A la Q.F.B. Luz Rojas por su colaboración pronta y decidida.

A la Q.F.B. Laura Medina por su compañerismo y cooperación.

Al M en C. Alejandro Azaola por el estímulo constante.

Al M en C. Norberto Manjarrez por el apoyo brindado.

A todos los compañeros de trabajo y amigos sin cuya solidaridad no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

INDICE

	Pág
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCION.....	3
Metaloproteinasas.....	3
Dominios Estructurales MMP.....	6
Regulación de Colagenasa Intersticial.....	8
Activación.....	12
Inhibición de las MMPs.....	13
Inhibidores Tisulares de las MMPs.....	13
OBJETIVO.....	18
MATERIALES Y METODOS.....	19
Modelo experimental.....	19
Preparación de los tejidos para hibridación <i>in situ</i>	19
Sondas Moleculares.....	20
Purificación de insertos.....	24
Marcado de las sondas.....	26
Detección de la sonda biotinada.....	27
Hibridación <i>in situ</i>	28
Hibridación <i>in situ</i> e inmunolocalización.....	29
Extracción de RNA celular.....	31
Purificación del RNA total.....	32
Northern Blot.....	33
RESULTADOS.....	36
DISCUSION.....	45
CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	48

ABREVIATURAS

α -2 M	Alpha 2 Macroglobuline
APMA	Aminophenylmercuric acetate
BCP	Basic calcium phosphate crystals
BSA	Bovine serum albumine
Chimp	Chiken Inhibitor Metalloproteinases
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	Diamidine Phenyl Indol Clorhidrate
EGF	Epidermal Growth Factor
GADP	Gliceraldehyde Deshidrogenase Phosphate
MMPs	Matriz Metalloproteinases
MOPS	Morpholine Propano Sulphonico Acide
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGE	Prostaglandine E
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PTH	Parathyroid Hormone
PUMP	Putative Uterine Metalloproteinases
SSC	Saline Sodium Citrate
TCSF	Tumor Cell Derived Collagenase Stimulatory
TE	Tris-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tisular Inhibitor Metalloproteinases
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPA	Tetracanoyl Phorfol Acetate
TRE	Tumor Promoter Responsive Element

RESUMEN

La búsqueda del mRNA para TIMP-1 y colagenasa, es importante para conocer los mecanismos de regulación de la matriz extracelular. El conocimiento de los tipos celulares involucrados permite verificar su participación en el proceso. Un modelo animal como el granuloma de carragenina fue utilizado para el presente estudio. El seguimiento a los 4, 7, 10 y 14 días después de la inyección subcutánea de carragenina, mediante hibridación *in situ* combinado con inmunofluorescencia, permitió identificar a los fibroblastos y a los macrófagos como responsables de la expresión de los mRNA de colagenasa y TIMP-1. El sistema utilizado para poner de manifiesto la reacción fue llevado a cabo revelando con Isotiocianato de floresceína-avidina y un anti-ratón marcado con rojo Texas.

Un Northern Blot del RNA total obtenido del granuloma a los diferentes tiempos, fue realizado para detectar la cantidad del mensaje expresado. La sondas colagenasa y TIMP humano se usaron para el ensayo. La sonda de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa sirvió como control

Los resultados muestran que durante la fase de depósito (4 y 7 días) el mRNA para colagenasa intersticial y TIMP-1 solamente fueron expresados por los fibroblastos como lo demuestra la colocalización de mRNA y vimentina. Por el contrario durante la fase de reabsorción (10 y 14 días) los fibroblastos y macrófagos expresan el mRNA para colagenasa y TIMP-1.

El Northern Blot reveló que los niveles de mRNA para colagenasa fueron más altos a los 10 y 14 días comparado con los 4 y 7 días. No se pudo observar la señal para el mRNA de TIMP-1 bajo las condiciones del ensayo.

Estas observaciones sugieren que durante la fase de reabsorción del granuloma, hay un aumento de la expresión del RNAm para colagenasa y la localización del mensajero se encuentra tanto en los macrófagos como en los fibroblastos.

INTRODUCCION

La remodelación del tejido conjuntivo que ocurre en condiciones biológicas normales tales como la morfogénesis, cicatrización, involución del útero postparto ó en ciertos procesos patológicos como artritis reumatoide, invasión tumoral, gingivitis, quemaduras de la cornea, ó diferentes enfermedades fibrosantes, involucra una serie de procesos complejos que comprenden tanto la síntesis como la degradación de diferentes macromoléculas de la matriz extracelular.

En particular, la degradación involucra a un conjunto de enzimas, entre las cuales destaca la familia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular.

METALOPROTEINASAS

Características Generales

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de calcio y zinc que degradan a varios componentes de la matriz extracelular. Son sintetizadas y secretadas por células del tejido conjuntivo y algunas células hematopoyéticas y estas macromoléculas son importantes en los procesos de remodelación normal¹ y en la destrucción acelerada de moléculas de la matriz que se observa en muchas enfermedades^{2,3}.

La regulación de las metaloproteinasas está rigurosamente controlada y ocurre a varios niveles,⁴ que incluyen:

- 1).- La expresión selectiva de los genes de MMPs y su inducción por una variedad de agentes biológicamente activos tales como factores de crecimiento, citocinas, oncoproteínas y promotores de tumores y algunas sustancias tales como cristales de urato, iones metálicos y serotonina^{5,6}.
- 2).- La activación de proenzimas *in vivo* que involucra la remoción de un fragmento amino-terminal.
- 3).- La inhibición de enzimas activas en el espacio extracelular dependiente de moléculas específicas como los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs).

A la fecha, se han identificado y secuenciado el cDNA de 9 tipos de metaloproteinasas. Entre ellas se encuentran dos tipos genéticos de colagenasa intersticial, dos colagenasas tipo IV (gelatinas), dos estromelisinias, la matrilisina (PUMP; putative uterine metalloproteinase), una "estromelisina-3" y una metalo-clastasa⁷. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Familia de las metaloproteinasas

MMP	Nombre Trivial	Sustrato
1	Colagenasa intersticial	Colágenas ti+po I,II,III,X, Gelatina, Proteoglicanos.
8	Colagenasa de neutrófilos	Colágena fibrilar, Gelatina Proteoglicanos.
3	Estromelisina-1	Proteoglicanos; enlaces covalentes de Colágenas II, IV y IX; Colágenas X y XI; Colagenasa, Laminina, Gelatina, Procolágenas, Fibronectina y Gelatinasa
10	Estromelisina-2	Idem Estromelisina-1 pero con menor actividad.
2	Gelatinasa A Colagenasa tipo IV de 72 Kd	Colágena desnaturalizada, Colágenas IV, V, VII, X, y XI, Elastina.
9	Gelatinasa B Colagenasa tipo IV de 92 Kd	Proteoglicanos, enlaces covalentes de colágenas idem Colagenasa A, Colágenas X y XI.
7	Matrilisina (PUMP)	Idem Estromelisina, Elastina.
11	Estromelisina-3	Desconocido.
12	Metaloelastasa	Elastina y Fibronectina.

La colagenasa intersticial (MMP-1) fue la primera en ser descubierta por Gross y Lapierre⁵¹, es la más específica de las MMPs, degrada a las colágenas intersticiales tipos I, II y III y produce un corte inicial en la triple hélice que resulta en fragmentos de tres

cuartos y un cuarto de la longitud total de la molécula. Es producida por la mayoría de las células del tejido conectivo y leucocitos, como se puede observar en el cuadro II.

Cuadro II. Fuentes celulares de colagenasa.

TIPO CELULAR	REFERENCIA
Células hepáticas Kupffer de rata	Fujiwara ²⁰ (1973)
Fibroblastos de piel humana	Stricklin ¹⁴ (1977)
Neutrófilos humanos	Murphy ²⁴ (1977), Hasty ²³ (1990)
Células tumorales	Liotta ²² (1983)
Fibroblastos sinoviales de conejo	Aggeler ¹² (1984)
Células endoteliales de conejo	Herron ¹¹ (1986)
Células del músculo liso bovino	Kishi ⁹ (1989)
Queratinocitos de rata y humanos	Lin ¹⁶ (1987), Petersen, ¹⁷ (1989) Saarialho-Kere ¹⁸ 1992
Fibroblastos sinoviales reumatoides	Okada ¹³ (1990)
Macrófagos alveolares	Campbell ¹²² (1991)Shapiro, ⁶⁷ (1993)
Monocitos de sangre periférica	Welgus ²¹ (1992)
Osteoblastos humanos	Meikle ⁸ (1992)
Células mesoteliales humanas	Marshall ¹⁰ 1993
Odontoclastos bovinos	Okamura ¹⁵ (1993)

Las colagenasas tipo IV de 92 y 72 Kd degradan colágenas tipo IV,V,VII, X y pueden actuar sinérgicamente con la colagenasa intersticial en la degradación de gelatina de todos los tipos de colágena²⁵. Se ha reportado que también degradan a elastina²⁶. Este grupo de MMPs comprende a la gelatinasa-A de 72 kd (MMP-2) y a la gelatinasa-B de 95 kd

(MMP-8) La gelatinasa-A de 72 kD esta ampliamente distribuida y se encuentra elevada en tumores malignos, es producida por fibroblastos y células epiteliales bronquiales humanas transformadas por el oncogen H-ras²⁷, lipocitos hepáticos humanos²⁸, células cancerosas de la próstata²⁹, carcinoma celular escamoso humano,³⁰ macrófagos y polimorfonucleares de cobayo, conejo, ratón y humano,³⁴ condrocitos de conejo y células endoteliales.³⁴ La gelatinasa-B de 92 kD, es sintetizada por fibroblastos de pulmón humano transformado por SV-40³², macrófagos alveolares de conejo, cobayo, ratón y humano³⁴, condrocitos de conejo y células endoteliales,³⁴ fibroblastos sinoviales humanos,^{62,183} monocitos humanos^{32,33}. Por hibridación *in situ* se ha demostrado en los eosinófilos, en carcinoma de células escamosas^{35,36}, en carcinoma mamario³⁷, en células de Kupffer³⁸, y en monocitos humanos^{34,21}.

Estromelisin-1 (MMP-3) y estromelisin-2 (MMP-10) Es una familia de enzimas que actúa sobre varios sustratos que incluyen a los proteoglicanos y la laminina y actúan en un rango muy amplio de pH. Además, se ha descrito que pueden activar a la colagenasa intersticial y a la gelatinasa-B de 95 kD³⁹.

Una MMP adicional ha sido identificada por cDNA en el estroma de cáncer mamario⁴⁰ en trofoblastos y en fibroblastos de pulmón fetal⁴⁰. Aunque la clona fue nombrada estromelisin-3, la proteína no ha sido expresada y la especificidad del sustrato es desconocida hasta el momento⁴⁰.

La matrilisina (MMP 7, PUMP) se encuentra relacionada con la estromelisin, pero carece del dominio C-terminal y tiene una amplia actividad proteolítica que incluye a la elastina, proteoglicanos, fibronectina y laminina. Su producción está asociada a monocitos inmaduros^{41,42}.

La más recientemente MMP identificada por cDNA en los macrófagos de ratón es la metaloclastasa (MMP-12), degrada fibronectina, caseína y $\alpha 1$ antitripsina⁴³.

Dominios estructurales de las metaloproteinasas.

Todas las metaloproteinasas de matriz contienen un propéptido de 77-87 aminoácidos (aa) que es responsable de la latencia de las proenzimas y que se pierde durante su activación. Este propéptido cuya secuencia PRCGV/NPD está conservada en las MMPs, contiene una cisteína que interactúa con el Zn^{++} del dominio catalítico adyacente, reemplazando a la molécula de agua requerida para su activación.⁴⁴ (Fig. 1)

El sitio catalítico de las MMPs con 162-173 aa ha sido definido por estudios bioquímicos y por ingeniería de proteínas. Una corta secuencia del sitio catalítico (HEL/I/FGH) presenta identidad con la termolisina bacteriana²⁶. Además del Zinc del sitio catalítico, se han identificado un segundo zinc y un ion calcio y se les ha atribuido una función importante en la estabilización de la estructura terciaria de la colagenasa⁴⁵. Este segundo Zinc se encuentra coordinado a His¹⁶⁸ Asp¹⁷⁰ His¹⁸³ e His¹⁹⁶ de una manera tetrahédrica⁴⁵.

Exceptuando a la matrilisina, las MMPs, presentan un dominio C-terminal, que muestra similitud con un dominio presente en la familia de las hemopexinas que incluye a la vitronectina. En la colagenasa y estromelisina este dominio se ha identificado como el responsable de mediar su interacción con las fibras de colágena⁴⁶. En la progelatinasa A (colagenasa tipo IV de 72 kDa), se ha demostrado que el C-terminal está involucrado en la interacción con TIMP-2 formando un complejo no covalente, que es capaz de ser activado por acetato de aminofenil-mercurio (APMA). La activación no disocia al TIMP-2 en la enzima activa^{47,48,49}.

Las gelatinasas presentan además un dominio que consiste de 3 secuencias repetitivas similares a las que se encuentran en las regiones de fibronectina por las cuales se une a gelatina. El papel preciso de este dominio no ha sido determinado⁵⁰.

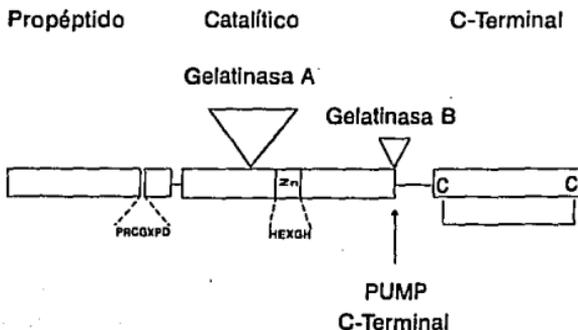


Fig 1. Dominios estructurales de las Metaloproteinasas

Regulación de Colagenasa intersticial (MMP-1).

De las colagenasas intersticiales la más estudiada es la de fibroblastos. Esta se sintetiza como una proenzima de 54 kDa, con un péptido señal de 19 aminoácidos. Los productos de secreción de la enzima de fibroblastos son un polipéptido de 52 kDa y otro secundario glicosilado de 57 kDa. Se desconoce el papel que desempeña la glicosilación, y se ha demostrado que no parece ser importante para la secreción de la proenzima ya que si se inhibe *in vitro* la glicosilación de la proenzima en un cultivo celular de fibroblastos no se inhibe su secreción al medio de cultivo^{56,14}.

La colagenasa de fibroblastos es secretada inmediatamente después de su síntesis, de esta manera el incremento de esta enzima en el espacio extracelular se interpreta como un aumento en la síntesis y no como la secreción de la enzima almacenada. En contraste, la colagenasa de neutrófilos se almacena en gránulos, de donde es posteriormente liberada^{58,24}.

Biosíntesis.

La expresión de colagenasa es modulada por una serie de moléculas diferentes, las cuales estimulan o inhiben, al menos *in vitro*, la síntesis de la enzima. Entre los factores de importancia fisiológica se han descrito promotores de tumores, hormonas, citocinas, algunos mediadores derivados del ácido araquidónico, las endotoxinas y varios factores de crecimiento. (Cuadro III, IV)

El acetato de forbol miristato (PMA) es un promotor de tumores, que estimula la producción de colagenasas en diferentes tipos celulares incluyendo a los fibroblastos de una gran variedad de tejidos^{59,60,61,12,62,63}.

La modulación de la expresión de colagenasa por varias hormonas ha sido demostrada en algunos sistemas. Así, por ejemplo, en útero de rata se ha demostrado que la progesterona inhibe la expresión de colagenasa⁶⁴, mientras que la serotonina, por el contrario, aumenta los niveles de mRNA⁶⁵. Por otro lado, la hormona paratiroidea (PTH) incrementa los niveles basales de mRNA de colagenasa intersticial en células osteoblásticas de rata⁶⁶ y los glucocorticoides como la dexametasona inhiben la expresión de la colagenasa en fibroblastos y macrófagos alveolares^{67,68,69,70}.

La estimulación de colagenasa por diferentes citocinas ha sido reportada en varios estudios experimentales. Entre ellos se han reportado linfocinas derivadas de linfocitos activados, y

monocinas de macrófagos. El factor de necrosis tumoral- α (TNF α), molécula derivada de linfocitos T, incrementa la producción de colagenasa en fibroblastos coriónicos, sinoviales y dérmicos humanos y también aumenta la expresión en los condrocitos^{71,72,73,74,75,76}. La leucoregulina induce la expresión de colagenasa en los fibroblastos humanos⁷⁷. La interleucina-1 favorece la síntesis de colagenasa en varios tipos celulares del tejido conectivo las cuales incluyen células sinoviales reumatoides, condrocitos, fibroblastos de diversos orígenes y células coriónicas^{78,79,80,81,82}. La interleucina-4 inhibe la expresión de colagenasa en los monocitos humanos⁸².

Varios factores de crecimiento que regulan la proliferación celular modulan la síntesis de procolagenasa. Entre ellos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), estimula la transcripción de colagenasa en los fibroblastos de piel^{83,70}, y en los queratinocitos de rata⁸⁴. En contraste, el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) disminuye la expresión de procolagenasa en fibroblastos gingivales humanos^{85,86}. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) estimula la expresión de colagenasa en los fibroblastos de piel humana⁸⁷. En los fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide estimulados con PDGF se induce la expresión de colagenasa⁸⁸.

El factor estimulador de colagenasa derivado de células tumorales (TCSF) se encuentra presente en la superficie de varios tipos de células neoplásicas y se ha demostrado que aumenta la expresión de colagenasa en fibroblastos de colon, pulmón fetal y en los fibroblastos de piel humana^{89,90}.

Por otro lado, existen evidencias que sugieren que las prostaglandinas (PGE) participan en la modulación de la expresión de colagenasa. Así por ejemplo, la PGE1 reduce el mRNA de la colagenasa de manera dosis dependiente y de una forma análoga a como lo realizan los inductores de AMPc⁹¹. La PGE₂, en cambio, incrementa la síntesis de colagenasa en células de osteosarcoma⁹².

Se han descrito otras sustancias o moléculas que intervienen en la modulación de la colagenasa, entre ellas se encuentran los cristales de fosfato de calcio (BCP), que es un factor de crecimiento que estimula la mitosis de los fibroblastos y actúa como un factor similar al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El BCP induce la síntesis de colagenasa en los fibroblastos sinoviales⁹³. Los retinoides causan una disminución en la secreción de colagenasa en los fibroblastos⁶⁸.

Cuadro III. Factores que estimulan la expresion de colagenasa en diversos tipos celulares.

INDUCTOR	CULTIVO CELULAR	REFERENCIAS
Esteres de forbol	Fibroblastos sinoviales de conejo	Brinckerhoff ⁶⁰ , Aggeler ¹²
Cristales de urato monosódico	Fibroblastos sinoviales de conejo	Brinckerhoff ⁶¹
Prostaglandina E ₂	Osteosarcoma de rata	Patridge ⁹²
Serotonina	Células de músculo liso de útero de rata	Wilcox ⁶⁵
Paratiroidea	Osteoblastos de rata	Quinn ⁶⁶
Interleucina-1	Células sinoviales, condrocitos humanos y queratinocitos de rata	Daye ⁷⁹ , Lefebvre ⁸⁰ , Lyons ⁸⁴
Leucorregulina	Fibroblastos de piel humana	Mauviel ⁷⁷
Interferon α β y γ	Fibroblastos de piel humana	Duncan ¹⁸¹
Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)	Fibroblastos coriónicos y dérmicos humanos	Ito ⁷¹ , Mitchell ⁷²
Cristales de fosfato de calcio	Fibroblastos de piel humana	McCarthy ⁹³
Factor de crecimiento epidermal (EGF)	Fibroblastos de piel humana	Delany ⁷⁰ , Colige ⁸³
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Fibroblastos de piel humana y sinoviales reumatoides	Bauer ⁸⁷ , Hiraoka ⁸⁸
Factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF)	Fibroblastos de piel humana	Edwards ⁸⁶
Factor estimulador de colagenasa derivado de células tumorales	Fibroblastos de piel humana y de colon	Prescott ⁸⁹ , Kataoka ⁹⁰
Leucotrieno C-4	Fibroblastos de pulmón	Medina L. ¹⁸⁴

Cuadro IV. Inhibidores de la expresión de colagenasa en diferentes tipos celulares.

AGENTE	CULTIVO CELULAR	REFERENCIA
Progesterona	Utero de rata, fibroblastos cervicales	Koob ⁶⁴
Dexametasona	Macrófagos alveolares fibroblastos de piel	Shapiro ⁶⁷ Clark ⁶⁸
Interleucina-4	Monocitos humanos	Corcoran ⁸²
Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)	Fibroblastos de pulmón fetal y gingivales humanos	Overall ⁸⁵
Retinoides	Fibroblastos de piel humana	Clark ⁶⁸
Prostaglandina E-1	Fibroblastos sinoviales	Salvatori ⁹¹

Estudios recientes han demostrado que el gen de la colagenasa es regulado a nivel transcripcional por diferentes oncogenes (Ras, mos, src, jun y fos) que codifican para factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, y proteínas involucradas en las señales de transducción. La activación puede ser inhibida por la banda sin sentido de *c-fos* sugiriendo que la oncoproteína nuclear *c-fos* es esencial para la activación transcripcional del gen de la colagenasa en fibroblastos murinos transformados⁹⁴.

Esta respuesta es mediada a través de los elementos TRE (Tumor promoter-responsive). El TRE se une al factor de transcripción AP-1 compuesto de dímeros de proteínas codificadas por las familias de oncogenes fos y jun. De hecho, todos los estimuladores de la expresión génica de colagenasa, por ejemplo los esteres de forbol (TPA), interleucina-1, factor de necrosis tumoral- α ó leucoregulina inducen la expresión de oncogenes de la familia jun y fos^{94,95,96}.

Algunas evidencias experimentales que apoyan este concepto son las siguientes: Clohisy y col. en 1992⁹⁷ demuestran que la PTH induce la expresión de los genes fos y jun en células osteoblásticas y que a su vez estimula a la colagenasa. Trabandt y col. en 1992^{98,99} demuestran que los protooncogenes *c-fos* y el gen de respuesta temprana (*egr-1*) se encuentran involucrados en la regulación transcripcional de la colagenasa en los fibroblastos gingivales y sinoviales obtenidos de pacientes con periodontitis crónica y artritis reumatoide. Brenner y col. en 1989¹⁰⁰ demuestran que el TNF- α aumenta la expresión de los genes *c-jun*, y el de la colagenasa.

Otro factor de transcripción, el PEA3 también se une al promotor de colagenasa y actúa sinérgicamente con AP-1 permitiendo la máxima expresión de la colagenasa inducida por TPA y por las oncoproteínas no nucleares como *v-src*, *Py-mt*, *Ha-ras*, *v-raf*, y *v-mos*⁹⁵.

El ácido retinoico inhibe la síntesis de colagenasa inducida por TPA, disminuyendo los niveles del mRNA de colagenasa sin afectar su vida media, lo cual indica que estos compuestos actúan a nivel de la transcripción. El ácido retinoico disminuye las oncoproteínas *fos* y *jun* y la unión de éstas al sitio AP-1¹⁰¹.

Activación.

La activación de la proenzima desempeña un papel muy importante en la regulación de la actividad colagenolítica^{44,102}. En la procolagenasa de fibroblastos de piel humana la activación proteolítica con plasmina resulta en la remoción de 81 aminoácidos de la porción amino terminal de la proenzima, y de un rompimiento adicional por la estromelina activa de aproximadamente 15 aminoácidos en la región carboxiterminal de la enzima¹⁰². (Fig-2)

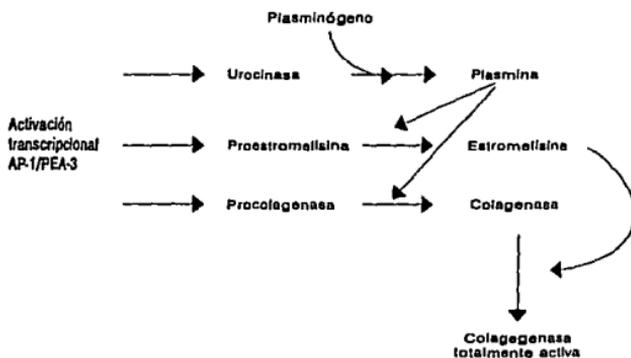


Fig 2. Activación de colagenasa por plasmina.

El tratamiento de la enzima con compuestos organomercuriales, tal como aminofenil mercurio acetato (APMA), activa a la procolagenasa, produciendo una enzima activa de 42 kd, por la remoción de los 81 aminoácidos de la porción amino terminal mediante un proceso autoproteolítico^{103,104}. Se ha reportado que la colagenasa de fibroblastos humana es activada sin cambios en el peso molecular de la enzima, por dodecil sulfato de sodio

(SDS). También, algunos agentes caotrópicos como el sulfocianuro de sodio, compuestos disulfuro como el glutatión oxidado, agentes alquilantes del grupo sulfhidrilo como la N-etil maleimida y agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio, han sido utilizados para la activación de la enzima^{44,102}.

Algunas de las enzimas que pudieran ser responsables de la activación *in vivo* de la procolagenasa, incluyen a la estromelina, activador del plasminógeno, plasmina, calicreína triptasa y catepsina B^{105,39,106,107}.

Con respecto a la colagenasa de neutrófilos, la enzima puede ser activada por reacciones con glutatión o por oxidación catalizada por mieloperoxidasa^{108,109}.

La activación de la colagenasa de fibroblastos humano, involucra la disociación de Cys⁷³ del átomo de Zinc y su remplazamiento por agua, con la concomitante exposición del sitio activo⁴⁴.

Inhibición de las metaloproteinasas.

La interacción de las metaloproteinasas con inhibidores específicos, desempeña un papel importante en la regulación de la proteólisis de la matriz extracelular. Diferentes tipos de inhibidores han sido reportados, entre los cuales destacan la α -2 macroglobulina (α -2M), y una familia de proteínas presentes en los tejidos y que se conocen como inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs).

La α -2 macroglobulina es una proteína del suero con un peso molecular de 720.000. El mecanismo de inhibición por α -2 M involucra la hidrólisis por la proteínasa de un sitio específico en una de las cuatro cadenas polipeptídicas de la α -2 M, con la consiguiente unión de la enzima con la α -2 M. La α -2 M se une a la colagenasa activa y no a la procolagenasa. Se ha señalado que el peso molecular de este inhibidor dificulta su salida de la circulación y en consecuencia limita su acción en la regulación de la matriz extracelular¹⁹.

Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs).

A la fecha, se han clonado, secuenciado y caracterizado bioquímicamente 3 de estos inhibidores, a los que se ha denominado TIMP-1, TIMP-2, y TIMP-3, nombrados de acuerdo a su descubrimiento. La secuencia de 8 TIMP de diferentes organismos reportan una estructura secundaria altamente conservada, caracterizada por los 6 puentes

disulfuro^{103,110,31,111,48}. Las proteínas son resistentes a la inactivación por calor ó pH ácidos, pero no a la reducción de los disulfuro. La molécula del TIMP presenta dos dominios importantes, el amino terminal que posee la actividad inhibitoria de las metaloproteinasas, y el carboxi terminal que forma complejos con las progelatinasas.¹⁹⁴ La región más conservada son los primeros 22 aminoácidos del amino terminal, (después del péptido señal) en donde 16 de los mismos son idénticos en las 8 proteínas reportadas. esta región contiene el sitio activo, (His⁷ y Gly⁹) importante para la interacción con el Zn del sitio activo de las metaloproteinasas.¹⁹⁵

El TIMP-1 es una glucoproteína básica de 28.5 kDa^{103, 112,113,114,115,116,117,118,119,10}. Es una proteína que se acumula en los fluidos tisulares, plasma, y fluido amniótico¹²⁰. Es producida *in vitro* e *in vivo* por muchas células incluyendo fibroblastos, células sinoviales, endoteliales, tumorales, mesoteliales, macrófagos, y células hepáticas^{8,103,121,10,122,104,123}. Su estructura primaria ha sido elucidada, y se ha demostrado que contiene 184 aminoácidos, dos sitios de unión a carbohidratos, 12 residuos de cisteína, y 6 puentes disulfuro que le confieren una marcada estabilidad a cambios de pH y temperatura^{114,103,124}. El TIMP es estable en pH ácido, es sensible a agentes reductores y por lo tanto es inactivado por reducción y alquilación⁶.

El TIMP-1 interactúa de forma no covalente con las MMPs activas como la colagenasa intersticial y estromelina. Forma un complejo con la progelatinasa-B de 92 kDa (procólagenasa tipo IV).¹⁹⁶ Por otro lado, no inhibe a la colagenasa bacteriana ni a la termolisina.

Además de su función inhibitoria de MMPs, el TIMP-1 posee actividad de factor de crecimiento la cual es idéntica a la actividad potencializadora de la eritropoyesis^{125,126}. Se ha señalado que el TIMP-1 tiene una actividad promotora del crecimiento para un amplio rango de células y se le propone como un nuevo factor de crecimiento o de proliferación celular^{127,128,129}.

La transcripción del gen de TIMP-1 es inducida por factores de crecimiento, citocinas, virus, ésteres de forbol, y suero. (Cuadros V, VI) Entre los factores de crecimiento se encuentran: el EGF y el TGF- β que inducen la expresión del TIMP-1^{83,130,131,132}. El TNF- α suprime la producción de TIMP en células coriónicas¹³³.

Entre las citocinas se encuentra la interleucina-6 sobre la cual existen reportes contradictorios ya que mientras Lotz y col. en 1991¹³⁴ Sato y col.¹³⁵ dicen que aumenta la

expresión de TIMP-1 en condrocitos y fibroblastos humanos, Emmonard y col. 1992¹³⁶ sostienen que no tiene ningún efecto. La oncostatina-M (OM), citocina derivada de monocitos y linfocitos, el factor inhibidor de leucemias (LIF) y la interleucina-1 α aumentan la expresión de TIMP en los fibroblastos de pulmón y en las células sinoviales¹³⁷. Por otro lado Mac Naul y col. 1990¹³⁸ señalan que la interleucina-1 no afecta la expresión de TIMP-1.

El ester de forbol y la hormona luteinizante (TPA y LH) aumentan los niveles de TIMP-1 en las células de la granulosa de rata¹³⁹. El ácido retinoico estimula la secreción de TIMP en células sinoviales¹⁴⁰

Cuadro V. Sustancias que estimulan la expresión de TIMP en diferentes tipos celulares.

INDUCTORES	CULTIVO CELULAR	REFERENCIAS
Factor de crecimiento epidermal (EGF)	Fibroblastos de pulmón fetal, piel	Edwards ⁸⁶ , Colige ⁸³
Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)	Fibroblastos gingivales sinoviales y de piel humanos	Overall ⁸⁵ , Wright ¹⁴⁰
Interleucina-6	Fibroblastos de piel y cervicales, hepatocitos fibroblastos sinoviales y endoteliales humanos	Kordula ¹¹⁸ , Sodek ¹³⁰ , Shingu ¹⁸² , Lotz ¹³⁴ , Sato ¹³⁵
Interleucina-1	Fibroblastos cervicales y de piel, condrocitos de conejo	Ito, ⁷¹ Lefebvre ⁸⁰
Factor inhibidor de leucemias (LIF)	Hepatocitos de rata	Richards ¹³⁷
Esteres de forbol	Células de la granulosa	Mann ¹³⁹
Hormona luteinizante	Células de la granulosa	Mann ¹³⁹ , Richards ¹³⁷
Retinoides	Fibroblastos de piel y sinoviales humanos	Clark ⁶⁸ , Wright ¹⁴⁰
Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)	Fibroblastos cervicales y coriónicos	Ito ⁷¹

Los estudios de transcripción han demostrado que la inducción de la expresión del TIMP-1 ocurre a nivel transcripcional. Los experimentos de transfección temporal del promotor del gen TIMP-1 murino, han revelado secuencias sensibles a los ésteres de forbol y al suero^{141,131} los cuáles se encuentran hacia el 5' del sitio de inicio de la transcripción y son los sitios de unión para el factor de transcripción API (*Fos/Jun*) y PEA3, un miembro de la familia de los proto-oncogen *c-ets*. Estos también se encuentran en los promotores del gen de la colagenasa y de la estromelisin, sugiriendo una base molecular para la expresión coordinada de las MMPs/TIMP-1. El AP-1 y el PEA3 son factores involucrados en la regulación de la transcripción de TIMP-1^{141,142,143,144}.

Cuadro VI. Sustancias que inhiben la expresión de TIMP en diferentes tipos celulares

AGENTE	TIPO CELULAR	REFERENCIA
Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)	Fibroblastos cervicales y sinoviales	Ito ⁷¹ , Shingu, ¹⁸² So ¹³³
Interfeucina-6	Fibroblastos de piel humana	Emmonard ¹³⁶
Interleucina-1	Endoteliales	MacNaul, ¹³⁸ Shingu ¹⁸²
Dexametasona	Macrófagos alveolares	Shapiro ⁶⁷

TIMP-2. Es una proteína no glucosilada de menor peso molecular que TIMP-1 (21 kDa). Comparte el 40 % de similitud con TIMP-1 y conserva los seis puentes disulfuro.

Goldberg y col³¹ han demostrado que este inhibidor interactúa preferentemente con la progelatinasa de 72 kDa (procólagenasa tipo IV). El TIMP-2 es expresado por células cancerosas, mesenquimatosas y neurales; además se ha encontrado en el fluido sinovial formando un complejo con la progelatinasa A^{145,146,116,147,148}.

El TIMP-2 es secretado por macrófagos alveolares en forma libre sin formar ningún tipo de complejo⁴³

Se ha demostrado que el TIMP-2 al igual que TIMP-1 es una molécula bifuncional ya que presenta actividad inhibitoria y de factor de crecimiento^{149,150}.

El TIMP-2 de ratón presenta 96% de identidad con el TIMP-2 humano lo que sugiere que se trata de una molécula altamente conservada¹⁵¹.

Es interesante señalar que el TIMP-1 forma un complejo con la progelatinasa B (colagenasa tipo IV de 92 kDa) y que el TIMP-2 lo forma con la progelatinasa A (colagenasa tipo IV de 72 kDa). La función regulatoria de estos complejos se desconoce^{152,153}.

TIMP-3, es una proteína de 21 kDa, se le conoce como Chimp 3 (Ckiken inhibidor metaloproteinasas), ha sido descrito en pollos. En los cultivos de fibroblastos transformados de pollo embrionario, el TIMP-3 favorece la liberación de las células de la matriz extracelular, promueve la proliferación de células no transformadas y la alteración fenotípica de las células^{154,155}. Recientemente, Silbiger y col. han logrado secuenciar el TIMP-3 en líneas celulares humanas¹⁸⁵.

Granuloma experimental inducido por carragenina.

La secuencia de los mecanismos responsables de la regulación de la colagenasa tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, no se conoce con precisión. Para su estudio y comprensión se han desarrollado numerosos modelos experimentales, uno de los cuáles lo constituye el granuloma inducido por carragenina en cobayos. Diversos estudios han demostrado que la inyección subcutánea de este polisacárido sulfatado resulta en una respuesta inflamatoria de predominio mononuclear, seguida de proliferación de fibroblastos y depósito exagerado de matriz extracelular. El granuloma, que puede alcanzar hasta 15 g de peso húmedo, es completamente reversible en 3 a 4 semanas.

El depósito de colágena que ocurre en la mayoría de las enfermedades fibrosantes es un proceso generalmente progresivo e irreversible a diferencia del granuloma que es un proceso reversible, hace de éste modelo un sistema ideal para analizar los mecanismos que operan en el control del metabolismo de la matriz extracelular.

Pardo y cols^{157,158,177,178}, han desarrollado diversos estudios para explorar los eventos responsables del depósito y reabsorción de colágena en este modelo experimental. De manera relevante para el desarrollo de este proyecto, conviene destacar la demostración de que la colagenasa intersticial, única enzima capaz de degradar a la colágena tipo I en estado nativo, se encuentra en el tejido desde el tercer día después de la inyección de carragenina y está presente durante toda la evolución del granuloma.^{157,158,177} Sin embargo, mientras parte de la actividad colagenolítica está inhibida durante los primeros 10 días, la enzima está completamente activa en la etapas que acompañan a la reabsorción del granuloma.¹⁷⁷ Asimismo, el análisis de la actividad inhibitoria de colagenasa en el

mismo granuloma demostró que ésta se encuentra presente durante toda la evolución del mismo, aunque existe un aumento significativo de TIMP libre en la fase de acumulación de colágena.¹⁷⁸

Las células involucradas en la expresión y síntesis de colagenasa y TIMP durante la evolución de este modelo experimental, se desconocen. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue:

Analizar la expresión y localización celular del mRNA de la colagenasa intersticial y del TIMP-I durante el desarrollo del granuloma inducido por carragenina en cobayos.

MATERIALES Y METODOS

MODELO EXPERIMENTAL

Cobayos de ambos sexos, con un peso promedio de 500 g, se inyectaron subcutáneamente en la región abdominal con 5 ml. de una solución estéril de carragenina (Viscarin, Marine colloids Inc Springfields New Jersey) al 1 % en NaCl 0.15 M de acuerdo al procedimiento descrito por Pardo y Pérez Tamayo¹⁵⁷. Grupos de tres animales se sacrificaron, bajo anestesia, por exsanguinación cardíaca a los 4, 7, 10 y 14 días después de la inyección de carragenina.

Preparación de los tejidos para hibridación *in situ*

Fijación de los tejidos

- 1.- Los granulomas se extrajeron y se cortaron en secciones de 0.5 a 1 cm de espesor.
- 2.- Se fijaron en para-formaldehído al 4 % en amortiguador de fosfatos 0.16 M pH 7.2 en NaCl 0.15M (PBS) por dos horas
- 3.- Se lavaron con glicina 0.2 M en PBS tres veces .
- 4.- Se dejaron en PBS para su posterior deshidratación e inclusión en parafina¹⁵⁹.

Tratamiento de laminillas

- 1.- Laminillas libres de grasa se sumergieron en una solución acuosa de gelatina al 0.1 % y sulfato de cromo y potasio 0.01 % durante un minuto
- 2.- Se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 h antes de ser usadas¹⁶⁰.

Inclusión del tejido en parafina.

Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Guelin¹⁶⁵.

- 1.- El tejido ya fijado se deshidrató en alcohol a diferentes concentraciones; 70, 80, 96 y 100% por una h cada uno.
- 2.- Se colocó en una mezcla de alcohol-xilol 50-50 % 1 h.
- 3.- Se puso en xilol por 2 h.
- 4.- Se sumergieron los tejidos en parafina a 60°C por 2h .
- 5.- Se cortaron secciones de 5 μ m con microtomo, y se colocaron en un baño María a 60°C con gelatina al 0.1 %.
- 6.- Se quitó la parafina en la estufa a 60°C durante una hora.
- 7.- Se hidrataron con xilol-alcohol y xilol por 10 min cada uno y se pasaron por un baño de alcohol al 100 % y un baño de alcohol al 96%.

Sondas moleculares.

Las sondas usadas en el presente trabajo fueron:

- 1.- cDNA de procologenasa humana.
- 2.- TIMP humano.
- 3.- TIMP de ratón. (Proporcionado por Edwards¹²⁶ D. Cancer Research Laboratory, University Western Ontario Canada). Es un cDNA, de 0.9 kb, que se encuentra incorporado en el plásmido pBR322. El sitio de inserción es BamHI y PvuII, resistente a ampicilina.
- 4.- Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADP).

Las sondas fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC).

La clona TIMP-3.9X contiene el inserto de inhibidor tisular de metaloproteinasas humanos, tiene un tamaño de 3.9 Kb, la clona total es de 6.7 Kb, es de origen genómico, se encuentra en el plásmido pTZ, el sitio de inserción es XbaI y es resistente a ampicilina¹⁹⁷.

La clona pClaseI contiene el inserto de colagenasa humana inducido por TPA, tiene un tamaño 2.054 Kb, la clona total es de 5.1 Kb, se encuentra en el plásmido pSP64, sitio de inserción PstI, se recupera con HindIII + SmaI, es resistente a ampicilina¹⁹⁸.

La clona pHcGAP contiene gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa humano, (GAPD) tiene un tamaño de 1.2 Kb, la clona total es de 5.6 kb, es un cDNA, el inserto termina en una cola de GC, se encuentra en el plásmido pBR322, se recupera con PstI, resistente a tetraciclina

La clona 16C8 contiene un inhibidor tisular de metaloproteinasa, fue aislada de una librería de fibroblastos embrionarios de ratón, tiene un tamaño de 0.9 kb, es un cDNA, el inserto presenta una cola de GC, se encuentra en el plásmido pBR322, se recupera con BamHI+PvuII, es resistente a ampicilina.¹²⁶

Con objeto de amplificar las sondas se hicieron los siguientes procedimientos.

Transformación genética.

La transformación genética de *Escherichia . coli*. se realizó usando el método de CaCl₂ reportado por Hanahah¹⁶²

- 1.- Se utilizó la cepa SF 8 de *Escherichia coli* (proporcionada por el Dr. Fernando Montiel de la Facultad de Química de la UNAM). Se sembró en medio de Luria (triptona 1%, extracto de levadura 0.5 %, cloruro de sodio 1%, agar 1.2 % , pH 7.4), sin antibiótico.
- 2.- Se incubó a 37°C durante 24 h.
- 3.- Una colonia del cultivo anterior se inoculó a 3 ml. de caldo Luria sin antibiótico (en un tubo de centrifuga) y se incubó a 37° C toda la noche.
- 4.- Al término se hizo una dilución 1:50 en caldo de luria y se incubó a 37 °C con agitación vigorosa.
- 5.- Se crecieron las células a una concentración de 5 X 10⁷ a 1 X 10⁸ células/ml (equivalente a una absorbancia a 600 nm de 0.55 - 0.6.), la cual

se alcanzó en aproximadamente tres horas después de iniciada la incubación.

- 6.- Las células se transfirieron a tubos de centrifuga de 50 ml, se enfriaron a 0°C y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C .
- 7.- La pastilla se recuperó en la mitad del volumen del cultivo original con CaCl₂ 50 mM frío, se colocó sobre hielo 5 min y se centrifugó a 3000 rpm 10 min a 4 °C. Obteniéndose las células competentes.
- 8.- Se recuperó la pastilla en 1/15 del volumen original de CaCl₂ 50 mM y se dejó en hielo 10 min.
- 9.- Las células competentes (0.2 ml) se colocaron en un eppendorf y se les adició 1 µg del DNA a amplificar (sondas moleculares) disuelto en 0.1 ml Tris 10 mM pH 7.5 dejándose incubar en hielo por 25 min.
- 10.-Posteriormente se aplicó un choque térmico a 37°C por 2 min (ó a 42°C), las células se dejaron a temperatura ambiente 10 min.
- 11.-Las células transformadas se colocaron en tubos de centrifuga con 3 ml de caldo Luria sin antibiótico y se incubaron 1 h a 37°C sin agitación.
- 12.-Se centrifugaron a 3000 rpm 10 min a temperatura ambiente.
- 13.-Se resuspendió la pastilla con 0.1 ml del líquido residual.
- 14.-Las células se transfirieron a cajas selectivas apropiadas (ampicilina ó tetraciclina según el caso), encontrándose las colonias resistentes a las 24h.

El medio de cultivo selectivo se preparó adicionando 20 mg por cada litro de medio del antibiótico deseado. Usualmente el antibiótico se prepara en una solución stock a una concentración de 50 mg del antibiótico por ml de agua (5 mg/ml de etanol en el caso de tetraciclina), se esteriliza por filtración (0.22 µm) y se guarda a -20°C hasta su uso.

Las células competentes se conservaron en glicerol estéril a una concentración final de 15% mezclándolas suavemente y congelando inmediatamente en un baño de hielo seco-etanol para su almacenamiento a -70°C.

Amplificación del DNA plasmídico.

Protocolo basado en el procedimiento de Birnboim y Doly¹⁶³

- 1.- *Escherichia coli* transformada se cultivó durante toda la noche a 37°C en 500 ml de medio Luria con ampicilina en agitación intensa (250rpm).
- 2.- Las células se cosecharon las células por centrifugación a 4000 x g 15 min a 4° C.
- 3.- La pastilla se resuspendió en 10 ml de una solución de lisis (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM) conteniendo 5 mg/ml de lisozima.
- 4.- El cultivo así tratado se transfirió a tubos de centrifuga y se incubó a temperatura ambiente por 5 min.
- 5.- Se agregaron 20 ml de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N, SDS 1% Se mezcló por inversión 5 a 6 veces (solución clara y viscosa) se colocó en hielo durante 10 min.
- 6.- Se adicionaron 15 ml de acetato de potasio 5 M frío pH 5 y se mezcló por inversión dejando en hielo por 5 min más al cabo de los cuales se centrifugó a 13000 x g durante 20 min a 4°C.

Purificación del DNA plasmídico.

- 1.- El sobrenadante obtenido en la etapa anterior se transfirió a dos tubos corex y fueron adicionados 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente por 15 min.
- 2.- Se centrifugó a 13000 x g durante 30 min a temperatura ambiente.
- 3.- La pastilla se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió con 1 ml de buffer Tris-EDTA (TE).
- 4.- Se adicionó RNAasa (20 µg/ml) y se incubó por 2 h a 37 °C.
- 5.- Se agregó un volumen igual de fenol equilibrado con Tris 0.1 M y un volumen de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), se

mezcló por inversión y se centrifugó en una microcentrífuga a alta velocidad.

- 6.- El DNA plasmídico se colectó en la fase acuosa (superior) y la fase orgánica se reextrajo con 0.5 volúmenes de Tris 0.1 M pH 7.4.
- 7.- A la fase acuosa se le adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 7.5 y 2.5 volúmenes de etanol frío y se dejó a -20°C . por dos horas
- 8.- Se centrifugó a $11000 \times g$ y se recuperó la pastilla con 1.6 ml. de agua desionizada estéril, agregando 400 μl de NaCl 4 M y 2 ml de polietilen glicol al 13 %. Se mezcló y se incubó sobre hielo por una hora.
- 9.- Se centrifugó a $10000 \times g$ durante 10 min a 4°C y la pastilla fue resuspendida en agua desionizada estéril, se guardó en congelación hasta su uso.

Purificación de los Insertos (Sondas Moleculares)

Protocolo basado en el procedimiento de Girvitz et al ¹⁶⁴.

Digestión enzimática.

- 1.- 1 μl del plásmido que contiene a TIMP de ratón fue digerido con 1 μl PvuII (Gibco) y 1 μl de buffer de mediana concentración de sales (NaCl 60mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl 7 mM) por 1 h a 37°C . Posteriormente se le adicionó 1.0 μl de BamHI y buffer de alta concentración de sales (100 mM NaCl, 20mM Tris-HCL, 7 mM Mg Cl) por 1 hora a 37°C .
- 2.- 1 μl del plásmido que contiene procolagenasa tipo I se digirió con 1 μl de Xma + HindIII con buffer alta concentración de sales.
- 3.- 1 μl del plásmido que contiene GAPD se digirió con un μl de Pst y Xba con buffer de mediana concentración de sales por 1 h a 37°C .
- 4.- 1 μl del plásmido que contiene TIMP humano fue digerido con 1 μl de XbaI con buffer de mediana concentración de sales durante 1 h a 37°C

Al finalizar el tiempo de incubación de cada uno de los plásmidos, fueron independientemente adicionados con el buffer de carga (37% sacarosa, 50mM de EDTA, 0.01% SDS y 0.1% de azul de bromofenol)

Electroforesis en geles de agarosa.

- 1.- El DNA digerido se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1% que contienen bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g/ml}$.
- 3.- La banda de interés se localizó con la ayuda de una lámpara de luz ultravioleta de onda corta y con un bisturi se hizo una incisión por debajo de dicha banda.
- 4.- Se colocó en la incisión una membrana de DEAE-Celulosa (Whatman DE 81) previamente tratada con NaCl 2.5 M. y se aplicó un voltaje de 100 V (de 3-5 min)
- 5.- La electroforesis se continuó hasta que la banda se transfirió a la membrana
- 6.- La membrana se colocó en un tubo eppendorf, se adicionó 200 μl de NaCl 1.5M en TE pH 7.5 y se dejó toda la noche a 4°C.
- 7.- El DNA se recuperó mediante un pulso de centrifuga de 45 seg para su elución y posterior extracción con un volumen de fenol-cloroformo y otro de cloroformo/isoamílico (49:1)
- 8.- Se centrifugó 10 min en una microcentrifuga y se recuperó la fase acuosa precipitándola con 1 ml de etanol frío.
- 9.- La pastilla se recuperó con 10 μl de TE corriéndose en un gel de agarosa para verificar la presencia del inserto purificado.

Marcado de las Sondas.

A.- Con radiactividad.

Para realizar el Northern Blot se utilizó la sonda marcada con α - ^{32}P -dCTP, por la técnica de Random Primer descrita por Feinberg Volgeisten¹⁶⁵ y bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (Dupont, Research Products) empleando un kit comercial.

- 1.- En un tubo eppendorf se agregaron 2 μl del DNA a marcar (200 ng) y 10 μl de TE, y se colocaron en un baño María a ebullición por 5 min.
- 2.- Se colocó inmediatamente en hielo y se le adicionaron 6 μl del buffer RPE 5X (Random Primer Extensión buffer), 6 μl de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (5X), 5 ml de α - ^{32}P - dCTP.(Actividad específica 6000 Ci/mmol)
- 3.- La reacción se inició por la adición de 1 μl de fragmento Klenow de la ADN polimerasa, la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 3 hrs.
- 4.- La reacción se detuvo por la adición de 2 μl de EDTA 0.5 M.
- 5.- La precipitación del ADN marcado se logró por la adición de 10 μl de ADN acarreador (ADN de esperma de salmón 5 mg/ml), 5 μl de Acetato de sodio 3 M pH 7.5, y 125 μl de etanol frío, dejándose reposar 5 min a temperatura ambiente.
- 6.- Se centrifugó 10 min en una microcentrífuga.
- 7.- Con la ayuda de una micropipeta se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 200 μl de TE .
- 8.- Para calcular la actividad específica alcanzada, se colocó un μl de la sonda marcada con α - ^{32}P -dCTP en un eppendorf de 0.5 ml.y se introdujo en un vial de centelleo seco y se determinó por exposición de la muestra a un aparato de centelleo por un min.

B.- Con biotina para hibridación *in situ*.

Para efectuar la técnica de hibridación *in situ*, la sonda (TIMP y colagenasa) fue marcada por la técnica de Nick Translation¹⁶⁶ siguiendo las instrucciones del proveedor (Enzo Biochemical) en la presencia de Bio-16-dUTP, (análogo biotinado del TTP). La reacción fue detenida cuando fragmentos de 200 bp fueron detectados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La sonda fue purificada a través de sephadex G-50 y guardada a -20°C hasta su uso.

- 1.- En un eppendorf se colocaron 5 µl de plásmido (1 µg de DNA total).
- 2.- Se marcaron con 10 µl de solución de desoxinucleótidos (A-4 = dATP 0.2 mM, dCTP 0.2 mM dGTP 0.2 mM, tris-HCl 500 mM pH 7.8, MgCl 50 mM y 2-mercaptoetanol 100 mM).
- 3.- Continuando con 10 µl de DNA polimerasa (DNA polimerasa 0.4 U/ml, DNAasa I 40 pg/ml, Tris-HCL 50 mM pH 7.5, Acetato de magnesio 5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, PMSF 0.1 mM y 100 µg/ml de albúmina sérica bovina libre de DNAasa).
- 4.- Finalizando con la adición 2 µl de Bio-16-dUTP (0.3 mM en 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) . y 23 µl de agua destilada y dejando 30 min a 37°C.
- 6.- La reacción fue detenida con 3 µl de EDTA 300 mM, pH 8.0.

Detección de la Sonda Biotinilada.

Con el objeto de verificar la incorporación de nucleótidos biotinados en las diferentes sondas moleculares usadas, se llevó a cabo la detección de estas luego de adherirlas a filtros de nitrocelulosa por la técnica de Dot Blot¹⁶⁷

- 1.- Se colocaron 10 µl de las diferentes diluciones de la sonda biotinada en filtros de papel de nitrocelulosa poniéndolas a 80°C por 2 h.
- 2.- Después de la fijación, los filtros fueron colocados en una solución de prehibridación conteniendo; albúmina sérica bovina al 1 % (BSA) y formamida al 50 % .

- 3.- La prehibridación se llevó a cabo durante 1 hr. a temperatura ambiente y con agitación ligera y constante.
- 4.- Se retiró la solución anterior y se adicionó el complejo ABC-Vector Labs. (de acuerdo con la metodología que se describirá en hibridación *in situ*) diluido en amortiguador de fosfatos salino (PBS) (fosfatos de sodio 10 mM pH 7.2 en NaCl 0.85 %) incubándose a 37°C durante una hora.
- 5.- Se retiró la solución y se enjuagó con PBS.
- 6.- Se reveló la reacción con una solución de diaminobenzidina (DAB) al 0.1% y peróxido de hidrógeno al 0.02 % en PBS.
- 7.- La reacción se detuvo eliminando la solución de DAB y enjuagando con agua destilada.
- 8.- Los filtros se dejaron secar al aire y se analizaron.

Hibridación *in situ* con la sonda biotilnada y revelado con peroxidasa

El protocolo de hibridación se basó en el descrito por Jiménez-García y col.¹⁶⁹. A partir del original de Gall y Pardue¹⁷⁰, Pardue y Gall¹⁷¹ y Singer y col. ¹⁷².

- 1.- Los portaobjetos con los tejidos ya fijados fueron hidratados con etanol 100% y 95 % y PBS dos veces, tres min. cada vez.
- 2.- Se adicionó peróxido de Hidrógeno al 3% en agua por 5 min para eliminar la peroxidasa endógena
- 3.- Los portaobjetos se lavaron 7 veces con PBS 10 min cada vez.
- 4.- El tejido fue permeabilizado con acetona al 100 % a -20°C por 3 min.
- 5.- Los portaobjetos se lavaron 5 veces con PBS 10 min cada vez.
- 6.- Se aplicaron 40 µl (12 ng sonda) de la mezcla de hibridación sobre cada portaobjetos.
La mezcla de hibridación consistió en: formamida al 50% , SSC 2X, BSA

0.2%, sulfato de dextran 10 %, DNA esperma de salmón 0.1 % y 0.3 mg/ml de la sonda biotinada. Precaentada a ebullición inmediatamente antes de su uso.

- 7.- Se incubó a 37°C durante 16-24 h en cámaras húmedas.
- 8.- Los portaobjetos conteniendo el tejido hibridado fueron flotados y enjuagados tres veces con PBS por 10 min cada vez.
- 9.- La hidridación con la sonda biotinada se detectó en el tejido mediante la incubación por una hora a 37°C con el complejo avidina-biotina-peroxidasa de rábano (complejo ABC, Vector Laboratories), 2 gotas del reactivo A más 2 gotas del reactivo B y 10 ml de PBS, preparados 30 min antes de su uso.
- 10.- Los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS durante 10 min cada vez a temperatura ambiente.
- 11.- El complejo ABC fue visualizado por la adición de DAB (diaminobenzidina) al 0.1 %, con peróxido de hidrógeno al 0.02 % en PBS, preparado en el momento de su uso.
- 12.- El tejido fue lavado con PBS y el precipitado café oscuro de los sitios de hibridación fue intensificado con tetraóxido de Osmio (OsO_4) al 1 % durante una hora.
- 13.- Las muestras fueron enjuagadas varias veces con agua destilada y deshidratadas en una serie creciente de alcohol (70 al 100 %), pasándolas por xilol. Las laminillas se montaron en bálsamo de Canadá.
- 14.- Las preparaciones se observaron en un microscopio de luz.

Hibridación *in situ* e Inmunolocalización

Un protocolo combinado para hibridación *in situ*, seguido de inmunolocalización fue realizado de acuerdo con Jiménez-García y col.¹⁷³.

- 1.- Los tejidos fueron lavados tres veces con PBS de 10 min cada uno y permeabilizados con triton X-100 al 0.2 % y suero normal de cabra 0.5 % por 5 min a 4°C.
- 2.- Los portaobjetos fueron enjuagados dos veces con PBS, 10 min cada una y en SSC 2X 5 min.
- 3.- Se adicionaron 20 µl de la mezcla de hibridación para alcanzar una concentración final de sonda marcada 5 ng/ml, SSC 4X, BSA 1 % y de sulfato de dextrán 10 %. a cada uno de los portaobjetos colocándolos en una cámara húmeda por 16 h a 42°C.
La mezcla de hibridación, en este caso, estuvo compuesta por 100 ng de sonda marcada con biotina, 20 µg de RNA^t de E.coli liofilizada, disueltos ambos componentes en 10 µl de formamida desionizada y desnaturalizados por calentamiento a 70 C durante 10 min, colocándolos en hielo al término. Posteriormente se adicionó el buffer de hibridación conteniendo 4 µl de dextran sulfato 50 %, 4 µl BSA al 5 % y 2 µl de SSC 20X.
- 4.- Los portaobjetos con el tejido fueron lavados con SSC 2X, formamida al 50% a 37°C por 30 min y con SSC 2X y SSC 1X por 30 min a temperatura ambiente para cada lavado.
- 5.- Para detectar el híbrido por fluorescencia, las células fueron incubadas con SSC 4X, BSA 0.25% y 2 mg/ml de isotiocianato de fluoresceína-avidina (FITC, Vector Laboratories), incubando 90 min a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 6.- Los portaobjetos fueron lavados con SSC 4X por 30 min a temperatura ambiente y con SSC 4X/tritón X-100, 0.1% tres veces por 10 min cada vez.
- 7.- La inmunolocalización se realizó de acuerdo con Spector and Smith 1986.¹⁹⁶ Usando un anticuerpo monoclonal de antivimentina (Dako) a una dilución de 1:5 en PBS incubando a 37°C por 30 min.
- 8.- Se lavó tres veces con PBS por 2 min a temperatura ambiente,

- 9.- Se adicionó el segundo anticuerpo, (Anti IgG de ratón) marcado con Texas red horse (Vector laboratories) a una dilución de 1:20 en PBS por 30 min a 37°C.
- 10.-Las células fueron contrateñidas con 4,6-diamidino-2 fenilindol-2 clorhidrato (DAPI) a una concentración de 1 mg/ml.
- 11.-Los portaobjetos fueron montados en glicerol al 90 % PBS 10 % más n-propil galato 4 % (w/v).
- 12.-Las células fueron examinadas con un microscopio Nikon FXA epifluorescente equipado con objetivos de 60 X, 1.4 NA.
- 13.-Todos los controles para las hibridaciones no específicas fueron realizadas con pSP64 o pTZ (plásmido sin el inserto)

Extracción de RNA celular

Fibroblastos de pulmón de cobayo JH4 clona 1 de la ATCC CCL 158 (pasaje 30). Fueron cultivados en medio Han's F12K (Sigma) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco, BRL), adicionado penicilina (100 U/ml), estreptomycin (10 mg/ml) y 0.25 mg/ml de anfotericina B. (Sigma)

- 1.- Los crioviales conteniendo a los fibroblastos se descongelaron rápidamente a 37°C. El contenido se colocó en un tubo de 15 ml con medio y 10 % de suero fetal bovino, (descomplementado previamente a 56°C por 30 min y se centrifugó a 800 rpm durante 10 min.
- 2.- La pastilla se recuperó con medio de cultivo adicionado de suero fetal bovino y se sembró en una caja de 25 cm². (falcon)
- 3.- Se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo y con una atmósfera de 5 % de CO₂ + 95 % de O₂. El medio se cambió de dos a tres veces por semana, hasta llegar a semiconfluencia.

Los fibroblastos fueron estimulados con acetato de forbol miristato (PMA) a una concentración final de 1×10^{-8} M (0.01 mg/ml) por 24 hr.

El medio fue removido y las células fueron lavadas con PBS estéril adicionándoles 2 ml de solución de lisis para la extracción del RNA de acuerdo a la técnica de Chomcynsky¹⁶⁸ como se describirá más adelante.

Purificación de RNA Total

El RNA total fue aislado de acuerdo con los métodos de Chomcynski y Sacchi¹⁶⁸ que combina la extracción de RNA con tiocianato de guanidina y fenol-cloroformo, obteniendo preparaciones de RNA puras y no degradadas. A continuación se describe el procedimiento.

- 1.- 100-200 mg de tejido fresco fue homogenizado en un politron (Brinkman instruments) a máxima potencia durante 20-30 segundos en 2 ml. de una solución (isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7.0, sarcosil 0.5% y 2-mercaptoetanol 0.1M).
- 2.- El homogenado se transfirió a un tubo corex de 50 ml. y se adicionaron. 0.2 ml de acetato de sodio 2M pH 4.0, 2 ml de fenol saturado en agua y 0.4 ml de cloroformo. La suspensión final se agitó y se enfrió en hielo por 15 min y se centrifugaron a 10000 x g por 30 min a 4° C.
- 3.- El RNA contenido en la fase acuosa (superior) fue precipitado con un volumen de isopropanol, 60 min a -70°C y se centrifugaron a 10000 x g durante 20 min a 4° C.
- 4.- La pastilla de RNA fue disuelta en 0.4 ml.de solución desnaturizante y extraída con un volumen igual de fenol-cloroformo y puesta a -20°C. por 5 min.
- 5.- La fase acuosa fué precipitada con 2.5 volúmenes de etanol y NaCl 0.1 M y se colocó a -70°C por una hora y se centrifugo a 10000 x g por 30 min a 4°C.
- 6.- La pastilla de mRNA fue disuelta en 50 µl de una solución 10 mM Tris-HCl pH 7.0+ 1 mM de EDTA (TE) .

- 7.- Para la lectura a 260/280 se tomaron 2 μ l de la solución de MRNA total en un 1.0 ml .de TE las lecturas se hicieron por duplicado.

Northern Blot

Electroforesis.

El RNA es separado en geles desnaturalizantes de acuerdo al procedimiento descrito por Thomas ¹⁷⁴

- 1.- Se preparó un gel de agarosa al 1 % en buffer MOPS (Acido 3(N-morfolino propanosulfónico).y se colocó en el molde del aparato de electroforesis.
1 gr. de agarosa fue disuelta en 75 ml de agua y se colocó en un horno de microondas por 3 min, se le adicionó 8.3 ml de MOPS 12 X (MOPS 0.24 M , Acetato de Sodio 0.06 M , EDTA disódico 0.012 M) y 16.25 ml de formaldehído al 37%.
- 2.- Las muestras de RNA total se desnaturalizaron y fueron colocadas con la solución de carga en el gel.
15 μ g de mRNA total se colocaron por 15 min a 65°C en 23 μ l de solución desnaturalizante (formamida 50%, MOPS 1X, Formaldehído 6 %) y se adicionaron 3 μ l de solución de carga (azul de bromofenol 0.25 % , xileno-cianol 0.25 % y glicerol 40%).
- 3.- Las muestras fueron corridas por 16-18 h a 10 V.
- 4.- Al finalizar el corrimiento electroforético el gel se sacó del molde y se enjuagó varias veces con agua destilada equilibrándolas con SSC 10X (Cloruro de sodio 1.5 M y citrato de sodio 0.15 M) durante 15 min a temperatura ambiente.

Transferencia.

El RNA desnaturalizado fue transferido a membranas de nitrocelulosa o de nylon de acuerdo al procedimiento descrito por Southern¹⁷⁵.

- 1.- Se preparó el sistema de transferencia por capilaridad, colocando sobre una placa de vidrio de 26 X 12 cm 2 hojas de papel whatman 3 mm previamente humedecidas en SSC 2X.
- 2.- El gel fue colocado de espaldas sobre el soporte sólido. Enseguida se puso la membrana de nitrocelulosa o nylon de 0.45 μm de 11.8 X 14 cm previamente humedecida en SSC 2X,
- 3.- Las burbujas que quedaron atrapadas entre el filtro y el gel se eliminaron con la ayuda de una varilla.
- 4.- Sobre la nitrocelulosa o el nylon se colocaron de 3 a 5 hojas de papel filtro Whatman 3 MM humedecidas en SSC 2X y 10 cm de papel absorbente (papel filtro, sanitas, esponja).
- 5.- Finalmente se colocó una placa de vidrio y un objeto de unos 300-500 g de peso, para facilitar el contacto íntimo de los diversos elementos.
- 6.- La transferencia se llevo a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente.
- 7.- Al finalizar la transferencia se retiraron los papeles absorbentes, la membrana se enjuagó en SSC 2X y se colocó entre dos hojas de Whatman 3 MM y se puso a 80°C por dos h.
- 8.- Se tiñó la membrana de nitrocelulosa o de nylon con una solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$) por 3 min y se enjuagó con agua desionizada estéril toda la noche.
- 9.- Se observó el blot en un transiluminador de U.V. de onda corta de 300 nm (Hoefler Scientific Instrumental), se obtuvieron las fotografías del mismo.

Hibridación.

- 1.- Los blots fueron colocados en bolsas de plástico y se prehibridaron con 20 ml.(75 ml/cm² de filtro) de buffer colocándolos a 42°C de 3 a 24 h. El buffer de prehibridación contiene formamida 50%, SSC 5X , fosfato de sodio 0.05 M pH 6.5, SDS 0.1 %, solución Denhard's 5X y DNA esperma de salmón 0.1 mg/ml .

- 2.- El buffer de prehibridación fue removido y colocado el de hibridación con la sonda marcada. (con 20×10^6 cpm por blot).
El buffer de hibridación fue preparado con formamida 50 %, SSC 5X, fosfato de sodio 50 mm PH 6.5, solución Denhard's 1X y dextran sulfato 10%.
Por otro lado la sonda marcada con α - $^{32}\text{PdCTP}$ y el DNA esperma de salmón fueron desnaturalizados por 5 min a 100°C , colocados sobre hielo por 1 min, y adicionándole al buffer de hibridación.
- 3.- Los blots fueron hibridados por 16-20 h a 42°C .
- 4.- Posteriormente los blots se lavaron cuatro veces con SSC 2X/SDS 0.1% por 5 min a temperatura ambiente y cuatro veces con SSC 0.1X/SDS 0.1% por 15 min cada vez a 42°C y una vez a 55°C .
- 5.- Después de los lavados las membranas, se enjuagaron con SSC 2 X , se secaron sobre dos papeles filtro Whatman 3 MM y se envolvieron en papel kleen pack y se colocaron dentro del casete.
- 6.- En el cuarto oscuro se colocó la película de rayos X de Kodak y se puso a 70°C por 48-72 h.
- 7.- Las películas fueron colocados en una solución reveladora (GBX, Kodak) por 5 min, enjuagados con agua 1 min y sometidas en la solución fijadora (GBX, Kodak) por 5 min y finalmente lavados con agua de la llave y secados a temperatura ambiente.

RESULTADOS

1.- Purificación y amplificación de las sondas

Se amplificaron y purificaron los plásmidos portadores de las secuencias codificantes para colagenasa, TIMP humano, gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa humano y TIMP de ratón.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos después de amplificar y purificar los plásmidos anteriormente mencionados. (1A, 4A, 1B, y 1C)

Se puede apreciar que después de la digestión con Xba + HindIII se obtuvo una banda de 2.054 Kb correspondiente al inserto de procologenasa humana. (3A)

Después de la digestión con XbaI se observa una banda de 3.9 Kb que corresponde al inserto de TIMP humano.(6A)

Después de la digestión con Pst + Xba se observa una banda de 1.2 Kb que corresponde al inserto purificado de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. (3B)

Después de la digestión con PvuII + BamHI se observa una banda de 0.9 Kb que corresponde al inserto de TIMP de ratón (3C)

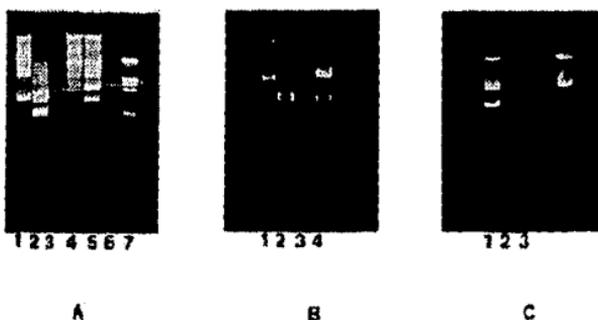


Fig 3. Presenta en los carriles 1 los plásmidos amplificados y purificados, en los carriles 2 los plásmidos digeridos y los 3 los insertos purificados. En la foto 3A los tres primeros carriles corresponden a colagenasa humana/Hind III+SmaI; los segundos a TIMP humano/XbaI. La 3B GAPD/EcoRI+HindIII y la 3C TIMP de ratón/PvuII+BamHI. El carril 4 de la figura 3A y 3B corresponde al fago Lambda digerido con EcoRI+HindIII

2.- Expresión de mRNA de colagenasa por fibroblastos de cobayo. Análisis por Northern blot

Debido a que se ha demostrado una baja similitud entre colagenasas de diversas especies (humana, ratón) se decidió realizar este experimento cuyo objetivo fue analizar si el cDNA de colagenasa humana hibridaba de forma específica con mRNA obtenido de fibroblastos de cobayo estimulado con forbol miristato, un conocido inductor de la enzima

En la figura 4 se observa que los fibroblastos de cobayo expresan un transcrito de 2.5 Kb (carril 1) que es semejante al observado en fibroblastos humanos.(carril 2) La figura 5 muestra la electroforesis del RNA total de fibroblastos de cobayo y humanos teñidos con bromuro de etidio.

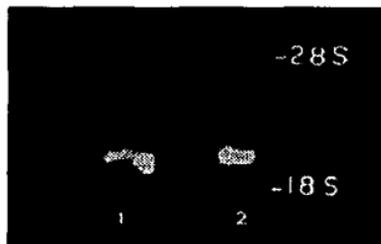


Fig 4. Autoradiografía del Northern blot de fibroblastos de cobayo (carril 1) y de humanos (carril 2), usando sonda de colagenasa humana.

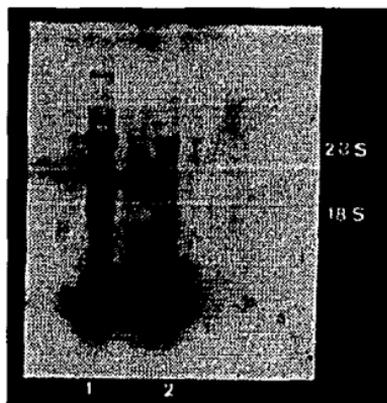


Fig 5. Tinción con bromuro de etidio de RNA total de fibroblastos de cobayo (carril 1) y humano (carril 2) estimulados con PMA.

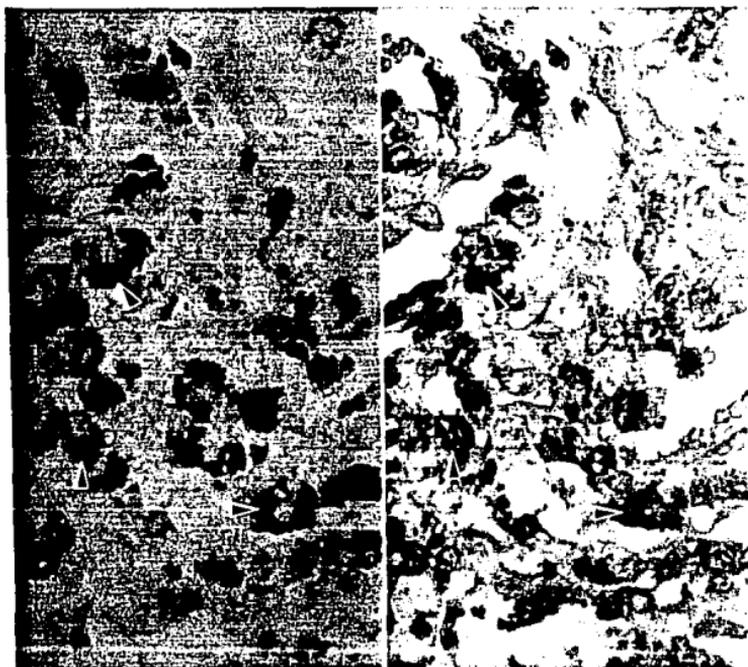


Fig 6. Hibridación *in situ* del granuloma de carragenina de 14 días, usando la sonda de TIMP de ratón marcada con biotina. El panel A representa la señal intensificada con tetraóxido de osmio. El panel B es la misma señal contrastada con una tinción celular de hematoxilina-eosina.

3.- Hibridación *in situ* y localización celular

a) Sonda marcada con biotina y revelada con peroxidasa.

Inicialmente se utilizó la sonda de TIMP de ratón marcada con biotina y revelada con peroxidasa, la hibridación se realizó en cortes de granuloma a los 7 y 14 días post-inyección de carragenina. Los resultados mostraron que a ambos tiempos había células que

expresaban el inhibidor. En la figura 6 se muestra este resultado y se observa la marca positiva en el citoplasma de algunas células.

Para identificar el tipo celular que expresa el mensaje para TIMP, se usó un anticuerpo monoclonal antivimentina (identifica células de origen mesenquimatoso, fibroblastos). Sin embargo no se logró detectar la vimentina en los fibroblastos, ya que el método de marcado con biotina y revelado con peroxidasa en la hibridación *in situ* enmascara la coloración que se obtiene por la reacción del anticuerpo con el antígeno; por lo que se decidió cambiar el método de detección del híbrido usando fluorescencia en lugar de peroxidasa de rábano.

b) Sonda marcada con biotina y revelada con fluorescencia

La hibridación *in situ* y el uso de un anticuerpo anti vimentina, permitieron la localización de los mRNA para colagenasa y TIMP, así como también la detección de los fibroblastos (positivos a vimentina). Además se usó una tinción con 4',6-diamidino-2 fenilindol-2HCl (DAPI), para teñir el núcleo celular y observar su morfología, y el número de organelos. Para visualizar la morfología del tejido se utilizó un microscopio con contraste diferencial de interferencia de acuerdo a Nomarski.

La figura 7 muestra la localización del mRNA para colagenasa y vimentina en las diferentes etapas de la evolución del granuloma, a los 4 y 7 días después de la administración de carragenina. Se observa el mRNA que codifica para colagenasa intersticial (panel C) el cual es expresado solo por los fibroblastos (panel B). A los 10 y 14 días hay más células que expresan el mensaje para colagenasa; se aprecian algunas células que son negativas a vimentina, que también expresan el mensaje. La marca para colagenasa se concentra en el citoplasma, y está excluida del núcleo como lo demuestra la tinción con DAPI (panel D)

Con respecto a la localización del mRNA de TIMP-1, (fig. 8) se observa un patrón similar al de mRNA de colagenasa durante todas las fases del granuloma. A los 4 y 7 días la expresión del mensaje solo se presenta en los fibroblastos. A 10 y 14 días se aprecian varias células negativas a vimentina que expresan el mensaje. En contraste a lo observado con colagenasa, el mRNA para TIMP-1 se encuentra presente en más células a los 14 días que a los 10 días.

Fig 7. A.-Contraste diferencial de interferencia según Nomarski **B** Inmunofluorescencia con anticuerpo anti vimentina **C.-** Hibridación con sonda de colagenasa humana. **D.-** Tinción específica de núcleos. Modelo Granuloma de Carragenina a los días 4, 7, 10, y 14.

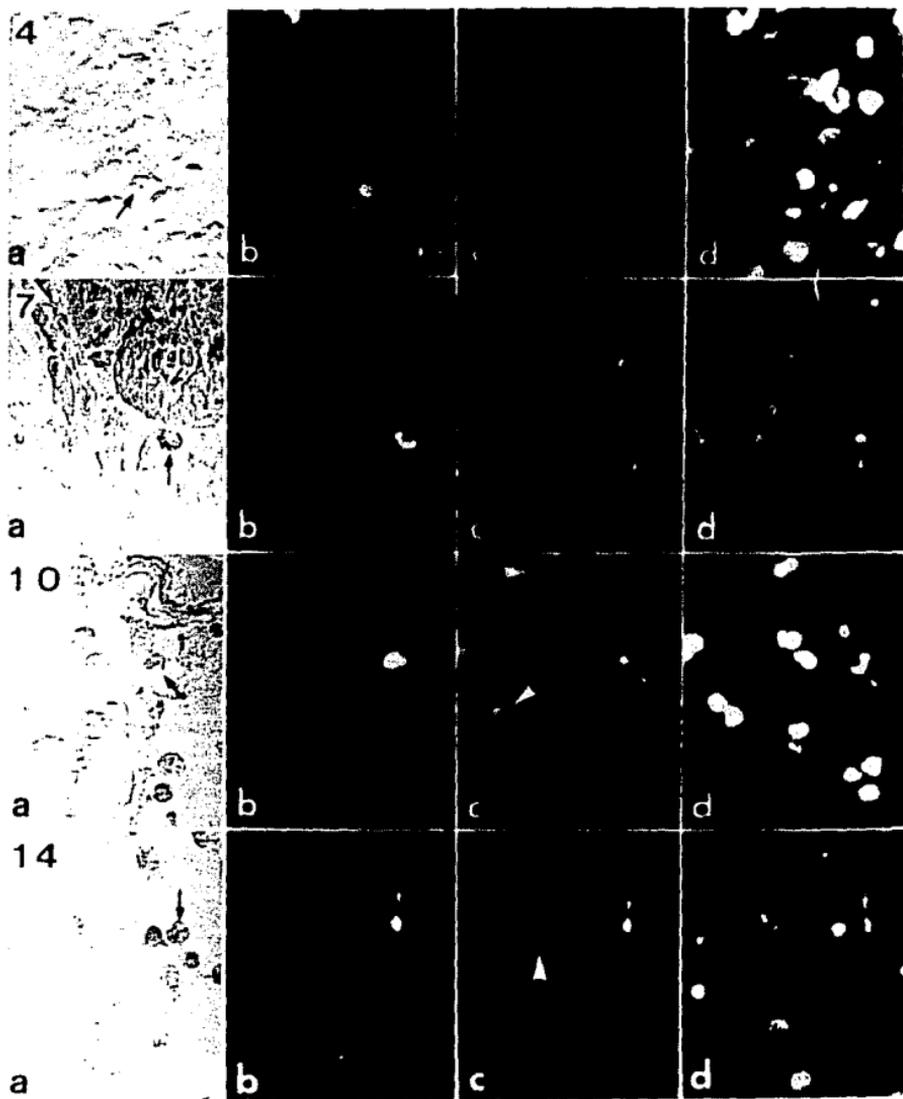
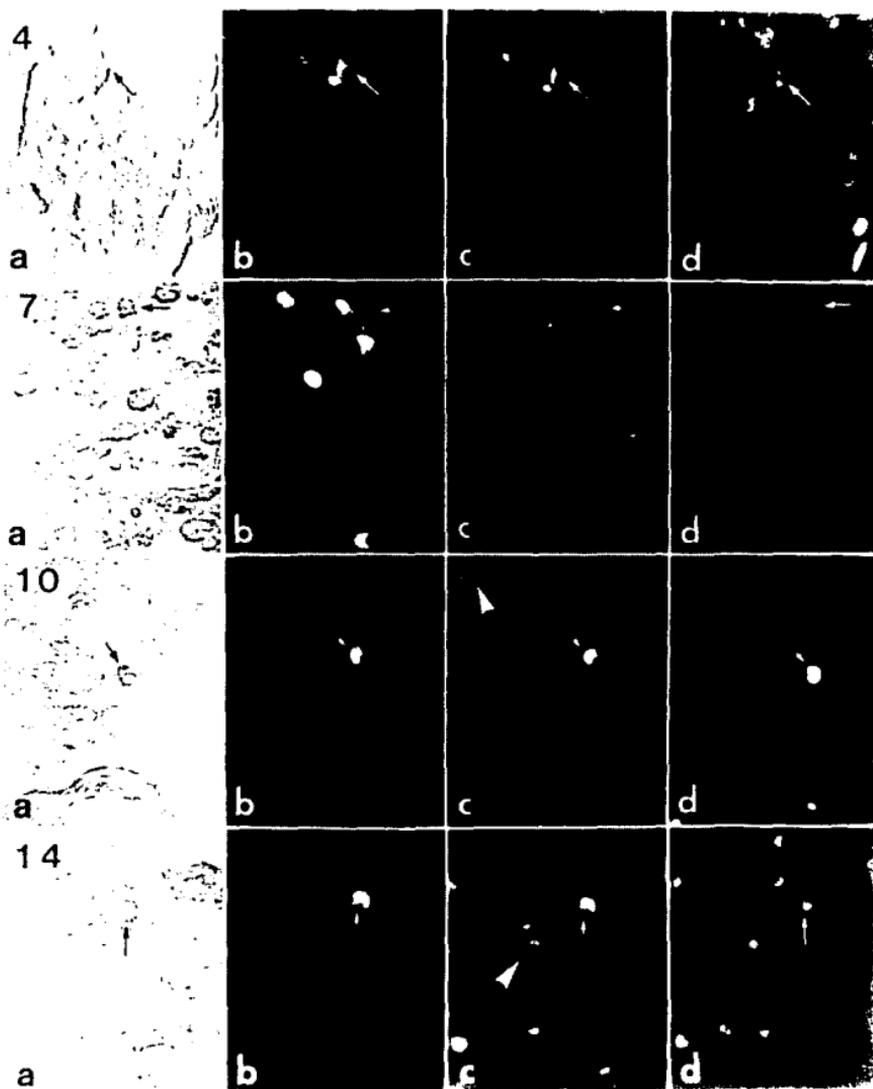


Fig 8. A.-Contraste diferencial de interferencia según Nomarski B.-Inmunofluorescencia con anticuerpo anti vimentina. C.-Hibridación con una sonda de TIMP humano. D.-Tinción específica de núcleos. Modelo Granuloma de Carragenina a los días 4, 7, 10, y 14.



4.- Análisis por el método de Northern Blot de la expresión de colagenasa y TIMP en tejidos.

El análisis por Northern Blot se llevó a cabo para establecer el patrón de expresión de la colagenasa en los 4 tiempos estudiados. El mRNA para colagenasa fue detectado a los 10 y 14 días después de la inducción del granuloma, con niveles más altos a los 10 días. Una señal muy débil fue observada a los 4 y a los 7 días. La rehibridación de los mismos filtros con un cDNA para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) muestra que las diferencias en expresión de la colagenasa no son atribuibles a variaciones en los niveles de mRNA cargados. (fig.9)

La hibridación con TIMP fue siempre negativa .

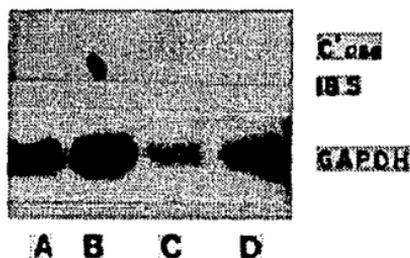


Fig 9. Northern Blot usando 10 μ g de RNA del granuloma de carragenina por línea. Los blots fueron hibridados con una sonda de colagenasa humana, marcada radiactivamente. A.- RNA 4 días, B.- RNA 7 días, C.- RNA 10 días y D.- RNA 14 días.

DISCUSION

El objetivo de este trabajo fue identificar los tipos celulares responsables de la expresión de colagenasa intersticial (MMP-1) y TIMP en las distintas etapas del desarrollo del granuloma. Los principales tipos celulares presentes durante la evolución de este modelo son los leucocitos polimorfonucleares, los macrófagos y los fibroblastos. Los neutrófilos desaparecen antes del inicio de la reabsorción de la matriz extracelular, y las principales células inflamatorias que se encuentran presentes en el granuloma son los fagocitos mononucleares. El número de fibroblastos aumenta progresivamente con el tiempo y durante la fase degradativa son los elementos celulares predominantes coexistiendo con los macrófagos.¹⁸⁶

En este estudio encontramos por hibridación *in situ*, que durante la fase de depósito de matriz extracelular, sólo los fibroblastos expresaban el mRNA de colagenasa intersticial y el TIMP-1. En todos los campos examinados sólo se encontraron células vimentino-positiva expresando el mensaje. Este hallazgo fue sorprendente ya que en estas etapas existen numerosos macrófagos mezclados con los fibroblastos, y se ha demostrado que los macrófagos son prominentes productores de colagenasa intersticial, al menos *in vitro*^{186,187,188,189}.

Este hallazgo, es similar al reportado en otros tejidos durante las etapas tempranas de reparación tisular. En este sentido, Girard y col.¹⁹⁰ han demostrado en el modelo de lesión de córnea que los fibroblastos son las únicas células que sintetizan colagenasa en el primer día después de la agresión. Asimismo, también se ha demostrado que los fibroblastos, producen colagenasa en la piel después de una herida¹⁹¹

En contraste, a los 10 y 14 días de la evolución del granuloma, cuando se está llevando a cabo la degradación masiva de la matriz extracelular, se detectaron células vimentino-negativas, presumiblemente macrófagos, que también expresaban el mensaje tanto para la enzima como del inhibidor. Existen numerosos trabajos reportando la producción de colagenasa y TIMP *in vitro* por macrófagos estimulados.^{186, 187, 188,189}

Los posibles mecanismos que explican porque los macrófagos no producen colagenasa y TIMP en los primeros días de la evolución del granuloma se desconocen. Una posible explicación de esta expresión relativamente tardía por los macrófagos podría estar relacionada a la diferenciación fagocítica-mononuclear. Se podría hipotetizar que los macrófagos que llegan al sitio de la lesión después de la agresión de carragenina son

monocitos, los cuales con el tiempo se diferencian en el tejido. De hecho, en este modelo experimental se ha documentado que el aspecto del citoplasma de los macrófagos varía con el tiempo, con un patrón altamente característico. En las etapas tempranas existen diferentes tipos de inclusiones citoplásmicas, algunas con estructuras membranosas. En contraste, en las etapas posteriores, el citoplasma de los macrófagos muestra muchas vacuolas pequeñas e irregulares generalmente vacías o con material granuloso¹⁵⁶. Se sabe que la diferenciación de células monocíticas en los tejidos comprende, junto con cambios morfológicos, diversas modificaciones bioquímicas que incluyen una transición en el perfil de las proteinasas sintetizadas. Así por ejemplo, se ha demostrado que la diferenciación de las células monocíticas U-937 es acompañada por un marcado aumento en la producción tanto de colagenasa intersticial como de TIMP.¹⁹²

Otra posible explicación fisiológica para el tardío compromiso de los macrófagos en la degradación de la colágena, podría estar relacionada con la estimulación de macrófagos por cambios en el microambiente. Se ha propuesto que las modificaciones en la cantidad y composición de la matriz extracelular pueden influir en el comportamiento de los macrófagos. En este sentido, Shapiro y col¹⁸⁰ encontró que la exposición de macrófagos alveolares humanos a colágenas tipo I y III estimulaban la expresión de colagenasa intersticial. En este mismo estudio, ellos encontraron que la síntesis de TIMP también se incrementó aunque en una magnitud inferior.

Podríamos especular que en el modelo de granuloma inducido por carragenina, ambos mecanismos operan. Por un lado la diferenciación de los monocitos a macrófagos activados y por el otro los cambios dinámicos en el microambiente que se reflejan por la acumulación de matriz extracelular, podrían explicar el porqué los macrófagos aparecen "tardíamente" expresando colagenasa y TIMP.

Finalmente los estudios por Northern Blot revelan que los niveles de mRNA para colagenasa son diferentes en los días examinados. En este sentido la participación de los macrófagos en la degradación de colágena coincide con los altos niveles del mRNA para colagenasa intersticial.

En el caso de TIMP, el Northern Blot del RNA de tejidos fué siempre negativo, lo que apoya la noción de que esta técnica es menos sensible que la hibridación *in situ*¹⁹³ puesto que permite la localización célula por célula.

CONCLUSIONES

- 1) Los genes de Colagenasa y TIMP se expresan en todos los días analizados en el presente trabajo, lo que corrobora que tanto la enzima como el inhibidor se expresan tanto en la etapa de depósito de matriz extracelular y en la de reabsorción.
- 2) Los fibroblastos son el tipo celular que expresa el mRNA de colagenasa intersticial y TIMP1 durante toda la evolución del granuloma.
- 3) Los macrófagos expresan el mRNA para la colagenasa y el TIMP-I exclusivamente en la etapa degradativa.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Brown C., Hembry R., and Reynolds J. Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. *J. Bone Joint Surg (Am)* 71-A:580-593, 1989.
- 2.- Henney A., Wakeley P., Davies M. et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8154-8158, 1991.
- 3.- Lohmander L.S., Hoerrner L.A. and Lark M.W. Metalloproteinases, tissue inhibitor and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Art. Rheu.* 36, 181-189, 1993.
- 4.- Harris E., Welgus H., and Krane S. Regulation of the Mammalian Collagenases. *Collagen Rel Res.* 4, 493-512, 1984.
- 5.- Emonard H., and Grimaud J. Matrix Metalloproteinases. A Review. *Cell. and Molecular Biol.* 36, 131-153, 1990
- 6.- Woessner F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5, 2145-2153, 1991.
- 7.- Matrisian L. The Matrix-Degrading Metalloproteinases. *BioEssays* 14, 455-462, 1992.
- 8.- Meikle M., Bord S., Hembry R., Compston J., Croucher P., Reynolds J. Human osteoblast in culture synthesize collagenase and other metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J.Cell.Sci.* 103, 1093-1099, 1992.
- 9.- Kishi J., and Hayakawa T. Synthesis of latent collagenase and collagenase inhibitor by bovine aortic medial explants and cultured medial smooth muscle cells. *Connec.Tissue Res.* 19, 63-76, 1989.
- 10.- Marshall B., Santana A., Xu Q., Petersen M., Campbell E., Hoidal J., and Welgus H. Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Mesothelial Cells. *J.Clin.Invest.* 91, 1792-1799, 1993

- 11.- Herron S., Banda M., Clark E., Gavrilovics J., and Werb Z. Secretion of Metalloproteinases by Stimulated Capillary Endothelial Cells.II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J.Biol.Chem.* 261, 2814-2818, 1986.
- 12.- Aggeler J., Frisch S., and Werb Z. Collagenase Is a Major Gene Product of Induced Rabbit Synovial Fibroblasts. *J.Cell.Biol.* 98, 1656-1661, 1984.
- 13.- Okada Y., Gonoji Y., Nakanishi I., Nagase H., and Hayakawa T. Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium. *Virchows. Archiv.B. Cell.Pathol.* 39, 305-312, 1990.
- 14.- Stricklin G., Bauer E., Jeffrey J., and Eisen A. Human Skin Collagenase: isolation of Precursor and Active Forms from both Fibroblasts and Organ Cultures. *Biochem.* 16, 1607-1615, 1977.
- 15.- Okamura T., Shimokawa H., Takagi Y., Ono H., and Sasaki S. Detection of Collagenase mRNA in Odontoclasts of Bovine Root-Resorbing Tissue by In Situ Hybridization. *Calcif. Tissue Int.* 52, 325-330, 1993.
- 16.- Lin H., Wells B., Taylor R., and Birkedal-Hansen H. Degradation of Type I Collagen by Rat Mucosal Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 262, 6823-6831, 1987.
- 17.- Petersen M., Woodley D., Stricklin G., and O'Keefe E. Constitutive production of procollagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by human keratinocytes in culture. *J Invest. Dermatol.* 92, 156-159, 1989.
- 18.- Saarialho-Kere U., Chang E., Welgus H., and Parks W. Distinct localization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases expression in wound healing associated with ulcerative pyogenic granuloma. *J.Clin.invest.* 90, 1952-1957, 1992.
- 19.- Sottrup-Jensen L., and Birkedal-Hansen H. Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulin. *J.Biol.Chem.* 264, 395-397, 1989.
- 20.- Fujiwara K., Sakai T., Oda T., and Igarashi S. The presence of collagenase in Kupffer cells of the rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 16300-16304, 1973.

- 21.- Welgus H., Senior R., Parks W., Kahn A., Ley T., and Shapiro S. Neutral proteinase expression by human mononuclear phagocytes: a prominent role of cellular differentiation. *Matrix Supp.* 1, 363-367, 1992.
- 22.- Liotta L., Rao C., and Barsky S. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* 49, 636-649, 1983
- 23.- Hasty K., Pourmotabbed T., Goldberg G., Thompson J., Spinella D., Stevens R., and Mainardi C. Human Neutrophil Collagenase. *J.Biol.Chem.* 265, 11421-11424, 1990.
- 24.- Murphy G., Reynolds J., Bretz U., and Baggiolini M. Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leukocyte. *Biochem.J.* 162, 195, 1977.
- 25.- Hibbs M., Hasty K., Seyer J., Kang A., and Mainardi C. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophils gelatinase. *J.Biol.Chem.* 260, 2493-2500, 1985.
- 26.- Murphy G.J.P., Murphy G., and Reynolds J.J.. The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett* 289, 4-7, 1991.
- 27.- Collier I., Wilhelm S., Eisen A., Marmor B., Grant G., Seltzer J., Kronberger A., He C., Bauer E., and Goldberg G. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TRE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* 263, 6579-6587, 1988.
- 28.- Arthur M., Stanley A., Iredale J., Rafferty J., Hembry R., and Friedman S. Secretion of 72 kDa type collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. *Biochem.J.* 287, 701-707, 1992.
- 29.- Stearn M., and Wang M. Type IV Collagenase (Mr 72,000) Expression in human prostate: benign and malignant Tissue. *Cancer Res.* 53, 878-883, 1993.
- 30.- Kusakawa J., Sasaguri Y., Shima I., Kameyama T., and Morimatsu M. Production of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase/type IV collagenase) and 3 (stromelysin) by cultured oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 21, 221-224, 1992.
- 31.- Goldberg G., Marmor B., Grant G., Eisen A., Wilhelm S., and He Ch. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of

- metalloproteases designates TIMP-2. *Proc.Natl.Acas.Sci.USA* 86, 8207-8211, 1989.
- 32.- Wilhelm S.M., Collier I.E., Marmer B.L., Eisen A.Z., Grant G.A., and Goldberg G.I. SV40-transformed human lung fibroblast secreted a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 264, 17213-17221, 1989.
 - 33.- Hibbs M., Hoidal J., and Kang A. Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and dentured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J.Clin.Invest.* 80, 1644-1650, 1987.
 - 34.- Murphy G. Hembry M., McGarrity M., and Reynolds J. Gelatinase (type IV collagenase) immunolocalization in cells and tissues: use of an antiserum to rabbit bone gelatinase that identifies high and low Mr forms. *J.Cell. Sci.* 92, 487-495, 1989.
 - 35.- Stahle-Backdahl M., Sudbeck B., Eisen A., Welgus H., and Parks W. Expression of 92-kDa Type Iv Collagenase mRNA by Eosinophils Associated with Basal Cell Carcinoma. *J.Invest.Dermat.* 99, 497-503, 1992.
 - 36.- Stahle-Backdahl M., and Parks W. 92-kd Gelatinase Is Actively Expressed by Eosinophils and Stored by Neutrophils in Squamous Cell Carcinoma. *American. J. Pat.* 142, 995-999, 1993.
 - 37.- Lyons G., Birkedal-Hansen B., Moore G., O'Grady R., and Birkedal-Hansen H. Characteristics of a 95-kDa Matrix Metalloproteinase Produced by Mammary Carcinoma Cells. *Biochem.* 30, 1449-1456, 1991.
 - 38.- Windwood P., Kowalshi-Saunders P., Green I., Murphy G., Hembry R., and Arthur M. Kupffer cells release a 95 kD gelatinase. *Cel.l. Mol. Aspects of Cirrhosis.* 216, 307-310, 1992.
 - 39.- Murphy G., Cokett M.I., Stephens P.E., Smith B.J., and Docherty A.J.. Stromelysin is an activator of procollagenase. A Study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.* 248, 265-268, 1987.
 - 40.- Basset P.J., Bellocq J.P., Wolf C. et al . A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348, 699-704, 1990.

- 41.- Quantin B., Murphy G., and Breathnach . Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 28, 5327-5334, 1989.
- 42.- Busiek D.F., Ross F.P., McDonnel S., Murphy G., Matrisian L.M., and Welgus H.G. Matrilysin (putative metalloprotease PUMP) is expressed in developing human mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 9087-9092, 1992.
- 43.- Shapiro S., Kobayashi D., and Welgus H. Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages regulation of biosynthesis is opposite to that of metalloproteinases and TIMP-1. *J.Biol.Chem.* 267, 13890-13894, 1992.
- 44.- Springman E., Angleton E., Birkedal-Hansen H., and Van Wart H. Multiples modes of activation of latent human fibroblasts collagenase: Evidence for the role of a Cys 73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Pro.Natl.Acad.Sci.USA.* 87, 364-368, 1990.
- 45.- Lovejoy B. Cleasby A., Hassell A., Longley K., Luther M., Weigi D., McGeehan G., McElroy A., Drewry D., Lambort M., and Jordan S. Structure of the Catalytic Domain of Fibroblast Collagenase Complexed with an inhibitor. *Science.* 263, 375-377, 1994.
- 46.- Murphy G., Allan J.A., Willenbrock F., Cokett M.I., O'Connell J.P., and Docherty A.J.P. The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J.Biol. Chem.* 267, 9612-9617, 1992.
- 47.- Brown P., Kleiner D., Unsworth E., and Stetler-Stevenson. Cellular activation of the 72 kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney International.* 43, 163-170, 1993.
- 48.- Ward R.V., Atkinson S.J., Slocombe P.M., Docherty A.J.P., Reynolds J.J., and Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits the activation of 72 kDa progelatinase by fibroblast membranes. *Biochim. Biophys Acta* 1079, 242-246, 1991.
- 49.- Howard E.W., Bullen E.C., and Banda M.J. Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *J.Biol. Chem.* 266, 13064-13069, 1991.

- 50.- Banyai L., and Patthy L. Evidence for the involvement of type II domains in collagen binding by 72 kDa type IV procollagenase *FEBS Lett.* 282, 23-25, 1991
- 51.- Gross J., and Lapiere C. Collagenolytic activity in amphibian tissues. A tissue culture assay. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 48, 1014, 1962.
- 52.- Ridge S., Oronsky A., and Kerwar S. Induction of the synthesis of latent collagenase and latent neutral protease in chondrocytes by a factor synthesized by activated macrophages. *Arthritis Rheum.* 23, 448-454, 1980.
- 53.- Moscatelli D., Jaffe E., and Rifkin D. Tetradecanoyl phorbol acetate stimulates latent collagenase production by cultured human endothelial cells. *Cells.* 20, 345-351, 1980.
- 54.- Nagai Y., Hori H., Hata R., Konomi H., and Sunada H. Collagenase production by adult rat hepatocytes in primary culture. *Biomed. Res.* 3, 345-349, 1982.
- 55.- Petersen M., Woodley D., Stricklin G., and O'Keefe E. Synthesis and regulation of keratinocyte collagenase *Matrix Supplement 1*, 192-197, 1992.
- 56.- Goldberg G., Wilhelm S., Kronberger A., Bauer E., Grant G., and Eisen A. Human fibroblast Collagenase. *J.Biol.Chem.* 261, 6600-6605, 1986.
- 57.- Hasty K.A., Pourmotabbed T.F., Golberg G.I., et al Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J. Biol Chem* 265, 11421-11424, 1990.
- 58.- Valle K., and Baver E. Biosynthesis of collagenase by human skin fibroblasts in monolayer culture. *J.Biol.Chem.* 254, 10115, 1979.
- 59.- Clark S., Wilhelm S., Stricklin G., and Welgus H. Coregulation of Collagenase and Collagenase Inhibitor Production by Phorbol Myristate Acetate in Human Skin Fibroblasts. *Arch.Biochem. Biophys.* 241, 36-44, 1985.
- 60.- Brinckerhoff C., and Harris Jr. E. Modulation by retinoic acid and corticosteroids of collagenase production by rabbit synovial fibroblasts treated with phorbol myristate acetate or poly(etilen glicol). *Bioch.Biophys. Acta.* 677, 424-432, 1981.

- 61.- Brinckerhoff C., Gross R., Nagase H., Sheldon L., Jackson R., and Harris Jr E. Increased level of translatable Collagenase Messenger Ribonucleic Acid in Rabbit Synovial Fibroblasts Treated with Phorbol Myristate Acetate or Crystals of Monosodium Urate Monohydrate. *Biochem.J.* 21, 2674-2679, 1982.
- 62.- Mac Naul K., Chartraint N., Lark M., Tocci M., and Hutchinson N. Discoordinate Expression of Stromelysin, Collagenase, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in Rheumatoid Human Synovial Fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 265, 17238-17245, 1990.
- 63.- Angel P., Baumann I., Stein B., Delius H., Rahmsdorf H., Herrlich P. 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate Induction of the Human Collagenase Gene Is Mediated by an Inducible Enhancer Element located in the 5-Flanking Region. *Mol.Cel.Biol.* 7,2256-2266, 1987.
- 64.- Koob T., and Jeffrey J. Hormonal regulation of collagen degradation in the uterus: inhibition of collagenase expression by progesterone and cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta.* 354, 61, 1974.
- 65.- Wilcox B., Rydelek-Fitzgerald L., and Jeffrey J. Regulation of Collagenase Gene Expression by Serotonin and Progesterone in Rat Uterine Smooth Muscle Cells. *J.Biol.Chem.* 267, 20752-20757, 1992.
- 66.- Quinn C., Scott D., Brinckerhoff C., Matrisian L., Jeffrey J., Partridge N. Rat Collagenase cloning amino acid sequence comparison and parathyroid hormone regulation in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 265, 22342-22347, 1990.
- 67.- Shapiro S., Campbell E., Kobayashi D., and Welgus H. Dexamethasone Selectively Modulates Basal and Lipopolysaccharide-induced Metalloproteinase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Production by Human Alveolar Macrophages. *J.Immunol.* 146, 2724-2729, 1991.
- 68.- Clark S., Kobayashi D., and Welgus H. Regulation of the Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases and Collagenase by Retinoids and Glucocorticoids in Human Fibroblasts. *J.Clin.Invest.* 80, 1280-1288, 1987.

- 69.- Mainardi C. Effect of dexamethasone, indometacin, and lipopolysaccharide on the secretion of interstitial collagenase and type V collagenase by cultured macrophages. *Biochem. Biophys. Acta.* 805, 137-142, 1984.
- 70.- Delany A., and Brinckerhoff C. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth and dexamethasone in cultured human fibroblasts. *J.Cel.Biochem.* 50, 400-410, 1992.
- 71.- Ito A., Sato T., Iga T., and Mori Y. Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. *FEBS.* 269, 93-95, 1990.
- 72.- Mitchell P., and Cheung H. Tumor necrosis factor alpha and epidermal growth factor regulation of collagenase and stromelysin in adult porcine articular chondrocytes. *J.Cell.Physiology.* 149, 132-140, 1991.
- 73.- Mitchell P., and Cheung H. Protein kinase regulation of tumor necrosis factor alpha stimulated collagenase and stromelysin message levels in chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 196, 1133-1142, 1993.
- 74.- Mac Naul K., Chartrain N., Lark M., Tocci M., and Hutchinson N. Differential effects of Il-1 and TNF alpha on the expression of stromelysin, collagenase and their natural inhibitor, TIMP, in rheumatoid human synovial fibroblasts. *Matrix Supplement.* 1, 198-199, 1992.
- 75.- Gronowicz G., Hadjimichael J., Richards D., Cerami A., and Rossomando E. Correlation between tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) induced cytoskeletal changes and human collagenase gene induction. *J.Period.Research.* 27, 562-568, 1992.
- 76.- Mawatari M., Kohno K., Mizoguchi H., Matsuda T., Asoh K., Van Dame J., Welgus H., and Kuwano M. Effect of tumor necrosis factor and epidermal growth factor on cell morphology, cell surface receptors, and the production of tissue inhibitor of metalloproteinases and IL-6 in human microvascular endothelial cells. *J. Immunology.* 143, 1619-1627, 1989.

- 77.- Mauviel A., Kahari V., Evans Ch., and Uitto J. Transcriptional Activation of Fibroblast Collagenase Gene Expression by a Novel Lymphokine, Leukoregulin. *J.Biol.Chem.* 267, 5644-5648, 1992.
- 78.- Katsura M., Ito A., Hirakawa S., and Mori Y. Human recombinant interleukin-1 alpha increases biosynthesis of collagenase acid in cultured human chorionic cells. *FEBS Letters.* 244, 315-319, 1989
- 79.- Dayer J., De Rochemonteix B., Burrus B., Demezuk S., and Dinarello C. Human recombinant interleukin I stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J. Clin. Invest.* 77, 645-648, 1986.
- 80.- Lefebvre V., Peeters-Joris Ch., and Vaes G. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alfa of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in defferentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim. Biophy. Acta* 1052, 366-378, 1990.
- 81.- Lefebvre V., Peeters-Joris Ch., and Vaes G. Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases (type IV collagenases) and inhibitor by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultured and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alfa. *Biochim. Biophy. Acta.* 1094, 8-18, 1991.
- 82.- Corcoran M., Stetler-Stevenson W., Brown P., and Wahl L. Interleukin 4 Inhibition of Prostaglandin E-2 Synthesis Blocks interstitial Collagenase and 92-kDa Type IV Collagenase/gelatinase Production by Human monocytes. *J.Biol.Chem.* 267, 515-519, 1992.
- 83.- Colige A., Lambert C., Nusgens B., Lapiere M. Effect of cell-cell and cell-matrix interaction on the response of fibroblasts to epidermal growth factor in vitro. *Biochem. J.* 285, 215-221, 1992.
- 84.- Lyons J., Birkedal-Hansen B., Pierson M., Whitelock J., and Birkedal-Hansen H. Interleukin-1 beta and transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor induce expression of M(r) 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblasts-type collagenase by rat mucosal keratynocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 19143-19151, 1993.

- 85.- Overall C., Wrana J., and Sodek J. Transforming Growth Factor-Beta Regulation of Collagenase, 72 KDa-Progelatinase, TIMP and PAI-1 Expression in Rat Bone Cell Populations and Human Fibroblasts. *Connective Tissue Research*, 20, 289-294, 1989.
- 86.- Edwards D., Murphy G., Reynolds J., Whitham S., Docherty A., Angel P., and Heath J. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* 6, 1899-1904, 1987.
- 87.- Bauer E., Cooper T., Huang J., Altman J., and Deuel T. Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 82, 4132-4136, 1985.
- 88.- Hiraoka K., Sasaguri Y., Komiya S., Inoue A., and Morimatsu M. Cell proliferation-related production of matrix metalloproteinases I (tissue collagenase) and 3 (stromelysin) by human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem. J.* 27, 1083-1091, 1992.
- 89.- Prescott J., Troccoli N., and Biswas C. Coordinate increased in collagenase mRNA and enzyme levels in human fibroblasts treated with tumor cell factor, TCSF. *Biochem. Inter.* 19, 257-266, 1989.
- 90.- Kataoka H., DeCastro R., Zucker S., and Biswas C. Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-KDa gelatinase. *Cancer Research.* 53, 3154-3158, 1993.
- 91.- Salvatori R., Guidon P., Rapuanó B., and Bockman R. Prostaglandin E 1 inhibits Collagenase Gene Expression in Rabbit Synoviocytes and Human Fibroblasts. *Endocrinology.* 131, 21-28, 1992.
- 92.- Partridge N., Jeffrey J., Ehlich L., Teitelbaum S., Fliszar C., Welgus H., and Kahn A. Hormonal regulation of the production of collagenase and collagenase inhibitor activity by rat osteogenic sarcoma cells. *Endocrinology* 120, 1956-1962, 1987.
- 93.- McCarthy G., Mitchell P., Struve J., and Cheung H. Basic calcium phosphate crystals cause coordinate induction and secretion of collagenase and stromelysin. *J.Cell.Phy.* 153, 140-146, 1992.

- 94.- Schonthal A., Herrlich P., Rahmsdorf H., and Ponta H. Requirement for fos Gene Expression in the Transcriptional Activation of Collagenase by Other Oncogenes and Phorbol Esters. *Cell*. 54, 325-334, 1988.
- 95.- Gutman A., and Wasylyk B. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J*. 9,2241-2246, 1990.
- 96.- Mauviel A. Cytokine Regulation of Metalloproteinase Gene Expression. *J. Cell. Biochem.* 53, 288-295, 1993.
- 97.- Clohisy J., Scott D., Brakenhoff K., Quinn C., and Partridge N. Parathyroid Hormone Induces c-fos and c-jun Messenger RNA in Rat Osteoblastic Cells. *Mol. Endocrinology*. 6, 1834-1842, 1992.
- 98.- Trabandt A., Aicher W., Gay R., Sukhatme V., Fassbender H., and Gay S. spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheum.Int.* 12, 53-59, 1992.
- 99.- Trabandt A., Gay R., Sukhatme V., and Gay S. Expression of collagenase and potential transcriptional factors c-fos and egr-1 in periodontal gingival fibroblasts. *J.Oral.Pathol.Med.* 21, 232-240, 1992.
- 100.- Brenner D., O'Hara M., Angel P., Chojkier M., and Karin M. prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α . *Nature* 337, 661-663, 1989
- 101.- Pan L., Chamberlain S., Aule D., and Brinckerhoff C. Differential regulation of collagenase gene expression by retinoic acid receptors- α , β and γ . *Nuc.Acids.Res.* 20, 3105-3111, 1992.
- 102.- He C., Wilhelm S., Pentland A., Marmer B., Grant G., Eisen A., and Goldberg G. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 86, 2632-2636, 1989.
- 103.- Stricklin G., and Welgus H. Human Skin Fibroblast Collagenase Inhibitor. *J.Biol.Chem.* 258, 12252-12258, 1983.

- 104.- Grant G., Eisen A., Marmer B., Roswit W., and Goldberg G. The activation of human skin fibroblasts procollagenase. Sequence identification of the major conversion products. *J.Biol. Chem.* 262, 5886, 1987.
- 105.- Nagase H., Cawston T., Desssilva M., and barret A. Identification of plasma kallikrein as an activator of latent collagenase in rheumatoid synovial fluid. *Biochem. Biophys. Acta.* 702, 133, 1982.
- 106.- Gruber B., Schwartz L., Ramamurthy N., Irani A., and Marchase M. activation of latent rheumatoid synovial collagenase by human mast cell tryptase. *J.Immunol.* 140, 3936, 1988.
- 107.- Eekhout Y., and Vaes G. Further studies on the activation of procollagenase. The latent precursor of bone collagenase. *Biochem. J.* 166, 21, 1977.
- 108.- Macarthey H., and Tschesche H. Latent and active human polymorphonuclear leukocyte collagenase. Isolation, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 130, 71, 1983.
- 109.- Weiss S., Peppin G., Ortiz X., Ragsdale C., and Test S. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science.* 277, 747, 1985.
- 110.- Stetler-Stevenson W., Krutzschs H., and Liotta L. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J.Biol.Chem.* 264, 17374-17378, 1989.
- 111.- Lark M., Saphos C., Walakovits L., and Moore V. In vivo activity of human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Bioch.Pharm.* 39, 2041-2049, 1990.
- 112.- Dean D., and Woessner F. Extract of human articular cartilage contain an inhibitor of tissue metalloproteinases. *Biochem.J.* 218, 277-280, 1984.
- 113.- Murphy G., Reynolds J., and Werb Z. Biosynthesis of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases by Human Fibroblasts in Culture. *J.Biol.Chem.* 260, 3079-3080, 1985.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 114.- Carmichael D., Sommer A., Thompson R., Anderson D., Smith C., Welgus H., and Stricklin G. primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Pro.Natl.Acad.Sci.USA.* 83, 2407-2411, 1986.
- 115.- Murray J., Allison K., Sudhalter J., and Langer R. purification and Partial Amino Acid Sequence of a Bovine Cartilage-derived Collagenase Inhibitor. *J.Biol.Chem.* 261, 4154-4159, 1986.
- 116.- Whitelock J., O Grady R., and Gibbins J. The identification and Characterisation of an inhibitor of collagenase (20K) produced by neoplastic epithelial cells. *Bioch. Biophys. Acta.* 1073, 107-113, 1991.
- 117.- Sudbeck B., Jeffrey J., Welgus H., Mecham R., McCourt D., and Parks W. Purification and characterization of bovine interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases. *Arch. Biochem.Biophys.* 293, 370-376, 1992.
- 118.- Kordula T., Guttgemann I., Rose-John S., Osthues A., Tschesche H., Koj A., Heinrich P., and Graeve L. Synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in human hepatoma cells (HepG2). Up-regulation by interleukin-6 and transforming growth factor beta 1. *FEBS Let.* 313, 143-147, 1992.
- 119.- Roswit W., McCourt D., Partridge N., and Jeffrey J. Purification and sequence analysis of two rat tissue inhibitors of metalloproteinases. *Archi.Biochem.Biophys.* 292, 402-410, 1992.
- 120.- Moutsakiis D., Mancuso P., Krutzsch H., Stetler-Stevenson W., and Zucker S. Characterization of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human plasma. *Connec. Tiss. Res.* 28, 213-230, 1992.
- 121.- Rifas L., Haistead L., Peck W., Avioli L., and Welgus H. Human Osteoblasts in vitro secrete Tissue Inhibitor of Metalloproteinases and Gelatinase but Not Interstitial Collagenase as Major Cellular Products. *J.Clin.Invest.* 84, 686-694, 1989.
- 122.- Campbell E., Cury J., Shapiro S., Goldberg G., and Welgus H. Neutral proteinases of Human Mononuclear Phagocytes. *J.Immun.* 146, 1286-1293, 1991.

- 123.- Stetler-Stevenson W., Brown P., Onisto M., Levy A., and Liotta L. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (TIMP) mRNA Expression in Tumor Cell Lines and Human Tumor Tissue. *J.Biol.Chem.* 265, 13933-13938, 1990.
- 124.- Williamson R.A., Marston F.A.O., Angal S. et al. disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem. J.* 268, 267-274, 1990.
- 125.- Docherty A.J.P., Lyons A., Smith B.J. et al Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318, 66-69, 1985.
- 126.- Edwards D.R., Waterhouse P., Holman L. and Denhardt D. A growth-responsive gene (16C8) in normal fibroblasts homologous to a human collagenase inhibitor with erythroid-potentiating activity : evidence for inducible and constitutive transcript. *Nucleic Acid. Res.* 14, 8863-8878, 1986.
- 127.- Hayakawa T., Yamashita K., Tanzawa K., Uchijima E., and Iwata K. growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Let.* 298, 29-32, 1992.
- 128.- Murate T., Yamashita K., Ohashi H., Kagami Y., Tsuchida K., Kinoshita T., Hotta T., Saito H., Yoshida S., Mori K., and et al. Erythroid potentiating activity of tissue inhibitor of metalloproteinases on the differentiation of erythropoietin-responsive mouse erythroleukemia cell line, ELM-1-1-3, is closely related to its cell growth potentiating activity. *Exp. Hemat.* 21, 169-176, 1993.
- 129.- Bertaux B., Hornebeck W., Courtalon A., Lebreton C., and Dubertret L. Stimulation of epidermal growth in equivalent skin by tissue inhibitor of metalloproteinases. *Pathol.Biol.* 38, 1029-1033, 1990.
- 130.- Sodek J., Overall C. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodeling. *Matrix Supplement.* 1, 352-362, 1992.
- 131.- Edwards D., Rocheleau H., Sharma R., Wills A., Cowie A., Hassell J., and Heath J. Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription. *Biochim. Biophys. Acta.* 117, 41-55, 1992.

- 132.- Overall C., Wrana J., and Sodek J. Independent Regulation of Collagenase, 72-kDa Progelatinase, and Metalloproteinase Inhibitor Expression in Human Fibroblasts by Transforming Growth Factor-Beta. *J.Biol.Chem.* 264, 1860-1869, 1989.
- 133.- So T., Ito A., Sato T., and Hirakawa S. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells. *Biol.Reprod.* 46, 772-778, 1992.
- 134.- Lotz M., and Guerne P. Interleukin-6-Induced the Synthesis of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1/Erythroid Potentiating Activity (TIMP-1/EPA). *J.Biol.Chem.* 266, 2017-2020, 1991.
- 135.- Sato T., Ito a., and Mori Y. Interleukin 6 enhances the production of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) but not that of matrix metalloproteinases by human fibroblasts. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 170, 824-829, 1990.
- 136.- Emonard H., Munaut C., Melin M., Lorat-Jacob H., and Grimaud J. Interleukin-6 does not regulate interstitial collagenase, stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases synthesis by cultured human fibroblasts. *Matrix.* 12, 471-474, 1992.
- 137.- Richards C., Shoyab M., Brown T., and Gauldie J. Selective regulation of metalloproteinases (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture. *J.Immunology.* 150, 5596-5603, 1993.
- 138.- Mac Naul K., Hutchinson N., Parsons J., Bayne K., and Tocci M. Analysis of IL-1 and TNF-alfa gene expression in human rheumatoid synoviocytes and normal monocytes by in situ hybridization. *J.Immunol.* 145, 4554-4166, 1990.
- 139.- Mann J., Kindy M., Hyde J., Clark M., and Curry T. Role of protein synthesis, prostaglandins, and estrogen in rat ovarian metalloproteinase inhibitor production. *Biol. Reprod.* 48, 1006-1013, 1993.
- 140.- Wright J., Cawston T., and Hazleman B. Transforming growth factor beta stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by human synovial and skin fibroblasts. *Biochim.Biophys. Acta.* 1094, 207-210, 1991.

- 141.- Campbell C., Flenniken A., Skup D., and Williams B. Identification of a Serum-and Phorbol Ester-responsive Element in the Murine Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Gene. *J.Biol.Chem.* 266, 7199-7206, 1991.
- 142.- Flenniken A., Campbell C., and Williams B. Regulation of TIMP gene expression in cell culture and during mouse embryogenesis. *Matrix. Suppl.* 1, 275-280, 1992
- 143.- Willard H., Durfy S., Mahtani M., Dorkins H., Davies K., and Williams B. Regional localization of the TIMP gene on the human X Chromosome. Extension of a conserved synteny and linkage group on proximal Xp. *Hum.Gent.* 81, 234-238, 1989.
- 144.- Ponton A., Coulombe B., Steyaert A., Williams B., and Skup D. Basal expression of the gene (TIMP) encoding the murine tissue inhibitor of metalloproteinases is mediated through API-and CCAAT-binding factors. *Gene.* 116, 187-194, 1992.
- 145.- Poulson R., Hanby A., Pignatelli M., Jeffrey R., Longcroft J. Rogers L., and Stamp G. Expression of gelatinase A and TIMP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin. *J.Clin.Pathol.* 46, 429-436, 1993.
- 146.- Miyazaki K., Funahashi K., Numata Y., Koshikaya N., Akaogi K., Kikkawa Y., Yasumitsu H., and Umeda M. Purification and characterization of a two-chain form of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) type 2 and a low molecular weight TIMP-like protein. *J. Biol. Chem.* 268, 14387-14393, 1993.
- 147.- Banda M., Howard E., Herron G., and Apodaca G. Secreted inhibitors of metalloproteinases (IMPs) that are distinct from TIMP. *Matrix Supplement.* 1, 294-298, 1992.
- 148.- Cawston T., Bigg H., Clark I., and Hazleman B. Identification of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)-progelatinase complex as the third metalloproteinase inhibitor peak in rheumatoid synovial fluid. *Annal. Rheum. Dis.* 52, 177-181, 1993.
- 149.- Stetler-Stevenson W., Bersch N., and Golde D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-poptentiating activity. *FEBS Let.* 296, 231-234, 1992.

- 150.- Stetler-Stevenson W., Krutzsch H., and Liotta L. TIMP-2: Identification and characterization of a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *Matrix Supplement*. 1, 299-306, 1992.
- 151.- Leco K., Hayden L., Sharma R., Rocheleau H., greenberg A., and Edwards D. Differential regulation of TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in normal and Ha-ras-transformed murine fibroblasts. *Gene*, 117, 209-217, 1992
- 152.- Strongin A., Marmer B., Grant G., and Goldberg G. Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *J.Biol.Chem.* 268, 14033-14039, 1993.
- 153.- Goldberg G., Collier I., Eisen A., Grant G., Marmer B., and Wilhelm S. Mosaic structure of the secreted ECM metalloproteinases and interaction of the type IV collagenase with inhibitors. *Matrix Supplement*. 1, 25-30, 1992.
- 154.- Pauloff N., Staskus P., Kishnani N., and Hawkes S. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3 .A third member of the TIMP family. *J.Biol.Chem.* 267, 17321-17326, 1992.
- 155.- Yang T., and Hawkes S. Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of culture chicken embryo fibroblasts *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 89, 10676-10680, 1992.
- 156.- Pérez-Tamayo R.. Collagen Resorption in Carrageenin Granulomas. II. Ultrastructure of Collagen Resorption. *Lab.Invest.* 22, 142-159, 1970.
- 157.- Pardo A., and Pérez-Tamayo R. The Collagenase of carrageenin granuloma. *Connect. Tissue Res.* 2, 243-245, 1974
- 158.- Pardo A., Rosenstein I., Montfort I., and Pérez-Tamayo R. Immunohistochemical Identification of Collagenase in Carrageenin Granuloma. *J.Histo.Cyt.* 31, 641-646, 1983.
- 159.- Bentley L.J.and Singer H.R. Quantitative analysis of in situ hybridization methods for the detection of actine gene expression. *Nucleic Acid. Res.* 13:1777-1799,1985
- 160.- Gall G.J. and Pardue M.L. Nucleic Acid Hybridization in Cytological Preparation. *Methods Enzymol.* 21:470-475,1971

- 161.- Guelin M., Kejzlarova-Lepesant J., and Lepesant J. In Situ Hybridization: A Routine Methods for parallel Localization of DNA Sequences and of their Transcripts in Consecutive Paraffin Sections with the use of ³H-Labelled Nick Translated Cloned DNA Probes. *Biol.Cell.* 53, 1-12, 1985.
- 162.- Hanahan D. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol. Biol.* 166, 557-560, 1983
- 163.- Birnboim H., and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acid. Res.* 7, 1513-1523, 1979
- 164.- Girvitz S.C., Bacchetti S., Rainbow A.J. and Graham L. A Rapid and Efficient Procedure for the Purification of DNA from Agarose Gels. *Anal.Biochem.* 106, 492-496, 1980
- 165.- Feinberg A., and Vogelstein B. A Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 132, 6-13, 1983.
- 166.- Rigby P.W.J., Dieckmann M., Rhodes C. and Berg P. Labeling Deoxyribonucleic Acid to High Specific Activity in Vitro by Nick translation with DNA Polymerase I. *J.Mol.Biol.* 113, 237-251, 1977.
- 167.- Kafatos F.C., Jones C.W. and Efstratiadis A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acid Res.* 7, 1541-1552, 1979
- 168.- Chomczynski P. and Sacchi N. Single-step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987.
- 169.- Jiménez-García L., Rothblum L., Busch H., and Ochs R. Nucleologensis: use of non-isotopic *in situ* hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biol.Cell.* 65, 239-246, 1989.
- 170.- Gall J., and Pardue M. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63, 378-383, 1969.

- 171.- Pardue M.L. and Gall J.G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc.Natl. Acad. Scie USA.* 64, 600-604, 1969
- 172.- Singer R.H., Lawrance J.B. and Villnave C. Optimization of *in situ* hybridization using isotopic and no isotopic detection methods. *Biotechniques* . 4, 230-250, 1986
- 173.- Jiménez-García L., and Spector D. In Vivo Evidence That Transcription and Splicing Are Coordinated by a Recruiting Mechanism. *Cell.* 73, 47-59, 1993
- 174.- Thomas P. Hybridization of denature RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc.Natl. Acad. Scie. USA.* 77:5201-5205,1980.
- 175.- Southern E.M. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragment Separated by Gel Electrophoresis. *J.Mol: Biol.* 98:503-517,1975
- 176.- Pérez-Tamayo R., and M.D. Collagen Resorption in Carrageenin Granulomas I. Collagenolytic Activity in in Vitro Explantes. *Lab.Investtg.* 22, 137-141, 1970.
- 177.- Figueras T., and Pardo A. Collagen biosynthesis and degradation during deposit and resorptive phases of Carrageenin Granuloma. *Collagen Rel.Res.* 6, 379-386, 1986.
- 178.- Pardo A., Ramirez R., Ramos C., Montañó M., and Selman M. Collagenase-inhibitor activity in deposit and resorption phase of guinea pig carrageenin granuloma. *Com. Tiss.Res.* 28, 307-315, 1992.
- 179.- Pardo A., Selman M., Ramirez R., Ramos C., Montañó M., Stricklin G., and Raghu G. Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs. *Chest.* 102, 1085-1089, 1992.
- 180.- Shapiro S., Kobayashi D., Pentland A., and Welgus H. Induction of macrophage metalloproteinases by extracellular matrix. Evidence for enzyme-and substrate-specific responses involving prostaglandin-dependent mechanisms. *J.Biol.Chem.* 268, 8170-8175, 1993.
- 181.- Duncan M., and Berman B. differential regulation of glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenase production in cultured human dermal fibroblasts by interferon-alpha,-beta, and gamma. *Arch. Dermatol. Res.* 281, 11-18, 1989.

- 182.- Shingu M., Nagai Y., Isayama T., Naona T., Nabunaga M., and Nagai Y. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 94, 145-149, 1993.
- 183.- Unemori E., Hibbs M., and Amento E. Constitutive Expression of a 92-kD Gelatinase (Type V Collagenase) by Rheumatoid Synovial Fibroblasts and its Induction in Normal Human Fibroblasts by Inflammatory Cytokines. *J. Clin. Invest.* 88, 1656-1662, 1991.
- 184.- Medina L., Pérez J., Ramírez R., Selman M., and Pardo A. Leukotriene C4 Upregulates Collagenase Expression and Synthesis in Human Lung Fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1994 (En prensa)
- 185.- Silbiger S., Jacobsen V., Cupples R., and Koski R. Cloning of cDNAs encoding human TIMP-3, a novel member of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *Gene.* 141, 293-297, 1994.
- 186.- Werb Z., and Gordon S. Secretion of specified collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 142, 346-360, 1975
- 187.- Wahl L., and Winter C. Regulation of guinea pig macrophages collagenase production by dexamethasone and colchicine. *Arch. Biochem. Biophys.* 230, 661-667, 1984.
- 188.- Welgus H., Campbell E., Bar-Shavit Z., Senior R., and Teitelbaum S. Human Alveolar macrophages produce a fibroblasts-like collagenase and collagenase inhibitor. *J. Clin. Invest.* 76, 219-224, 1985.
- 189.- López-Escalera R., and Pardo A. Carrageenin stimulated peritoneal macrophages release in vitro collagenase and gelatinase. *Collagen Rel. Res.* 7, 249-257, 1987.
- 190.- Girard M., Matsubara M., Kublin C., Tessier J., Cintron C., and Fini E. Stromal fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodeling. *J. Cell. Science.* 104, 1001-1011, 1993.
- 191.- Porras-Reyes B., Blair H., Jeffrey J., and Mustoe T. Collagenase production at the border of granulation tissue in healing wound: Macrophages and Mesenchymal collagenase production in vivo. *Connect. Tiss. Res.* 27, 63-71, 1991.

- 192.- Shapiro S., Doyle G., Ley T., Parks W., and Welgus H. Molecular mechanisms regulating the production of collagenase and TIMP in U-937 cells: evidence for involvement of delayed transcriptional activation and enhanced mRNA stability. *Biochemistry*. 32, 4286-4292, 1993.
- 193.- Jiménez-García L., Pérez J., Selman M., and Pardo A. Cellular Source of Collagenase and TIMP-1 in Carrageenin Induced Granuloma. *Exp. Mol. Pathol.* (En prensa).
- 194.- Murphy G., Houbrechts A., Cockett M., Williamson R., O'Shea M., and Docherty A. The N. terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry*. 30, 8097-8102, 1991.
- 195.- O'Shea M., Willenbrock F., Williamson R., Cockett M., Freedman R., Reynolds J., Docherty A., and Murphy G. Site-directed mutation that alter the inhibitory activity of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1: importance of the N-terminal region between Cysteine 3 and Cysteine 13. *Biochemistry*. 31, 10146-10152, 1992.
- 196.- Spector D., and Smith H. Redistribution of U-snRNPs during mitosis. *Exp. Cell. Res.* 163, 87-94, 1986.
- 197.- Durphy S., Clark S., Williams B., and Willard H. RFLP detected by an X-linked cDNA encoding erythroid-potentiating activity/tissue inhibitor of metalloproteinase (EPA/TIMP). *Nucleic. Acids. Research*. 14, 9226, 1986
- 198.- Angel P., Baumann I., Stein B., Delius H., Rahmsdorf H., and Herrlich A. 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol*. 7, 2256-2266, 1987.