

26
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Actividad elastolítica, gelatinolítica y contenido de colágena en lavados broncoalveolares de cobayos expuestos a humo de cigarro.

T E S I S

Que para obtener el Título de
B I O L O G O

Presenta:

José Guadalupe Cisneros Lira

Director de Tesis: M. en C. Martha Montano Ramírez



México, D.F. FACULTAD DE CIENCIAS SEC. DE ESCOLAR

1997

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Actividad elastolítica, gelatinolítica y contenido de colágena en lavados broncoalveolares de cobayos expuestos a humo de cigarro.

realizado por José Guadalupe Cisneros Lira

con número de cuenta 8727572-2, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

**Director de Tesis
Propietario**

M. en C. Martha Montaña Ramírez *Martha Montaña R.*

Propietario

M. en C. Carlos Ramos Abraham *Carlos Ramos*

Propietario

Dra. María de Lourdes Segura Valdéz *María de Lourdes Segura Valdéz*

Suplente

Dr. Luis Felipe Jiménez García *Luis Felipe Jiménez García*

Suplente

M. en C. Julia Pérez Ramos *Julia Pérez R.*

Consejo Departamental de Biología

**CONSEJO DEPARTAMENTAL
DE BIOLOGÍA**

***Con todo mi cariño, admiración y respeto
dedico esta tesis a mis padres:***

Hipólito Cisneros y Martha Lira

***Por su apoyo incondicional, por su gran
esfuerzo y por creer en mí.***

Gracias!!

***A mis hermanos Esteban y Enrique
Ojalá que este trabajo los motive y los
impulse en su superación personal.***

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: M. en C. Martha Montaña Ramírez y M. en C. Carlos Ramos Abraham por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en el área del conocimiento, por su amistad y su apoyo durante la realización de esta tesis.

A mi maestra, amiga y gran compañera de trabajo: M. en C. Julia Pérez Ramos, por sus inmejorables consejos, por impulsarme día a día a ser mejor, por el apoyo brindado para realizar este trabajo y por haber permitido que yo fuese cómplice de sus conocimientos.

A la Dra. María de Lourdes Segura Valdéz, por su ayuda, sus acertados consejos y por ser una excelente compañera de trabajo.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, por haber aceptado amablemente ser parte del comité tutorial y por sus acertadas sugerencias.

*A mis amigos e inmejorables compañeros de estudio:
Adriana, Ale, Verena y Roberto por su amistad y apoyo
a lo largo de la carrera.*

*Al M. en C. Juan Marquez Luna por su amistad, su ayuda y por
compartir con migó la magia natural de la biología.*

*A mis compañeros de trabajo: Carina, Lorena y en especial a
mi amigo Javier; gracias por tu amistad y por tu ayuda
incondicional.*

*A la familia Gatica, en especial a mi gran amiga de tantos años
Guadalupe, por haberme contagiado de su chispa, por su cariño,
y por su apoyo.*

A Ana Belem, por su ayuda tan especial, gracias!

*A toda la gente que a lo largo de mi carrera estudiantil
me brindo su apoyo y su confianza, a quienes siempre
creyeron en mí.*

A ella...

ÍNDICE

	Pag.
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	
MATRIZ EXTRACELULAR PULMONAR	5
FAMILIA DE LAS COLÁGENAS	6
Estructura	6
Tipos de colágena	7
Biosíntesis	8
FIBRAS ELÁSTICAS	11
Estructura	11
Biosíntesis	12
Fibrilogénesis	13
DEGRADACIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR	13
PROTEASAS	14
Metaloproteinasas de matriz	15
Elastasa de neutrófilos	20
ENFISEMA PULMONAR	22
Definición	22
Causas (Hipótesis Proteasas-Antiproteasas)	23
CONSECUENCIAS DEL HABITO DE FUMAR CIGARROS	24
ANTECEDENTES	
MODELOS ANIMALES DE ENFISEMA PULMONAR	25
Modelos inducidos con humo de cigarro	26
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	29

MATERIAL Y MÉTODOS	
MODELO EXPERIMENTAL	30
EXPOSICIÓN DE LOS ANIMALES A HUMO DE CIGARRO	30
OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	31
ANÁLISIS MORFOLÓGICO	31
ANÁLISIS BIOQUÍMICO	
Contenido de proteínas	32
Contenido de colágena	33
Actividad elastolítica	34
Actividad gelatinolítica	35
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
RESULTADOS	
ANÁLISIS HISTOLÓGICO	38
OBTENCIÓN DE MUESTRAS	
Lavados broncoalveolares	40
Conteo celular	41
ANÁLISIS BIOQUÍMICO	
Concentración de proteínas totales y colágena	43
Actividad elastolítica	44
Actividad gelatinolítica	46
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ABREVIATURAS

α_1 - AT= Alfa-1- antitripsina	mg= Miligramo
α_2 - M= Alfa-2- macroglobulina	μ g= Microgramo
Ala= Alanina	ml= Mililitro
Arg= Arginina	μ l= Microlitro
Asn= Asparagina	mM= Milimolar
Asp= Ácido aspártico	MMP= Metaloproteinasas de matriz extracelular.
CaCl ₂ = Cloruro de calcio	MT-MMP= MMP-tipo membrana
CO ₂ = Bióxido de carbono	N= Normal
cpm= Cuentas radiactivas por minuto	nm= Nanómetro
Cys= Cisteína	NO= Oxido de nitrógeno
Da= Daltones	O ₂ = Oxígeno
Des= Desmosina	OHlys= Hidroxilisina
DNA= Ácido desoxirribonucleico	OHpro= Hidroxiprolina
cDNA= DNA complementario	PA= Persulfato de amonio
EDTA= Ácido etilen-diamino tetracético	pb= Pares de bases
EGF= Factor de crecimiento epidermal	PDGF= Factor de crecimiento derivado de plaquetas
FGF= Factor de crecimiento fibroblástico	Phe= Fenilalanina
g= Gramos	Pro= Prolina
Gln= Glutamina	RER= Retículo endoplásmico rugoso
Glu= Ácido glutámico	RNA= Ácido ribonucleico
Gly= Glicina	mRNA= RNA mensajero
GP= Glicoproteína	r.p.m.= Revoluciones por minuto
[³ H]= Tritio	SDS= Duodecil sulfato de sodio
HCl= Ácido clorhídrico	Ser= Serina
H-E= Hematoxilina-eosina	SSF= Solución salina fisiológica
His= Histidina	TEMED= N,N,N, N-Tetrametiletilendiamina
Ide= Isodesmosina	TGF- α = Factor de crecimiento transformante-alfa
IL-1= Interleucina-1	TGF- β = Factor de crecimiento transformante-beta
IL-4= Interleucina-4	TIMP= Inhibidor tisular de MMP
Ile= Isoleucina	TNF- α = Factor de necrosis tumoral-alfa
Kb= Kilobases	Tris= Hidroximetil-aminometano
kDa= Kilodaltones	V= Volumen
Kg= Kilogramos	Val= Valina
LBA= Lavado broncoalveolar	Zn ²⁺ = Zinc
Leu= Leucina	ZnCl ₂ = Cloruro de zinc
Lys= Lisina	
M = Molar	
MAGP= Glicoproteína asociada a microfibrillas	
Met= Metionina	

RESUMEN

El enfisema es originado por la degradación excesiva de moléculas del intersticio pulmonar, con la subsecuente ruptura de paredes alveolares. Durante más de 30 años el proceso catabólico se ha explicado en términos de un daño elastolítico como consecuencia de un desequilibrio elastasas-antielastasas. En un estudio reciente con cobayos, se sugiere que también la colagenasa intersticial puede desempeñar un papel importante en la génesis del enfisema, sugiriendo que este proceso es resultado de un incremento en la actividad colagenolítica; sin embargo, se desconoce si el lavado broncoalveolar (LBA) puede reflejar éste y otros procesos proteolíticos ocurridos en el intersticio pulmonar.

Para analizar el posible papel que desempeñan las enzimas elastolíticas y gelatinolíticas, en este trabajo se evaluaron sus niveles de actividad, así como la presencia de colágena soluble, en LBA de cobayos expuestos a humo de cigarro (20 cigarros/día, 5 días/1, 3, 4, 6, y 8 semanas); como controles se utilizaron cobayos del mismo peso y sexo no expuestos al humo de cigarro. Los animales se instilaron con SSF por vía intratraqueal y el LBA recuperado se centrifugó para separar el componente celular del molecular. La fracción celular se utilizó para un conteo total y diferencial. Del sobrenadante se midió el contenido de proteína total. Para determinar el contenido de colágena, se cuantificó la presencia de hidroxiprolina con una técnica colorimétrica. La actividad elastolítica se midió utilizando placas con elastina marcada con [³H] y por otro lado, se determinó la actividad de gelatinasas mediante zimogramas de gelatina (0.1%).

Los resultados mostraron que existe un incremento en el número de células recuperadas (Células $\times 10^5$ /ml) en los LBAs de los animales experimentales, este aumento fue significativo en los cobayos expuestos durante 4, 6, y 8 semanas al humo de cigarro (9.31 ± 1.4 , 8.06 ± 1.9 , y 7.85 ± 1.9 respectivamente), en comparación con los controles (5.0 ± 1.07 ; $p \leq 0.05$). Del conteo celular diferencial se encontró que los macrófagos constituyen la población más abundante y su número tendió a incrementarse en los animales experimentales; sin embargo, no se demostraron diferencias significativas. El mismo comportamiento se evidenció para los neutrófilos, no obstante, las diferencias entre los grupos de 4, 6, y 8 semanas comparados contra el grupo control, fueron estadísticamente significativas. Con respecto al contenido de proteína total no se encontraron evidencias de un cambio significativo en el contenido de proteína total, pero sí en el contenido de colágena ($\mu\text{g/ml}$), que mostró un incremento significativo a partir de la 4^a semana; sin embargo, el aumento fue más evidente a la 6^a semana (3.71 ± 1.51 en experimentales vs 1.8 ± 0.28 en controles; $p \leq 0.01$). En cuanto a la actividad elastolítica (μg Elastina degradada/ml), sólo el grupo de animales experimentales de 8 semanas mostró un aumento significativo respecto a su grupo control (12.65 ± 2.25 vs 9.06 ± 1.51 respectivamente; $p \leq 0.05$). Por su parte, un análisis densitométrico a los zimogramas demostró que en los grupos experimentales fue evidente un incremento en la intensidad de las bandas que corresponden a gelatinasas de $M_r \sim 66$ y 95 kDa, respecto al grupo de animales controles; a pesar de ello, sólo la intensidad de la banda correspondiente a la gelatinasa con $M_r \sim 95$ kDa mostró diferencias significativas en los grupos experimentales de 6 y 8 semanas.

Los resultados de este trabajo acerca del aumento en el contenido de colágena soluble, así como el incremento en la actividad de enzimas elastolíticas y gelatinolíticas, correlacionan fuertemente con el incremento de células en los LBA de los grupos experimentales. Estos datos, sugieren que los procesos colagenolíticos y/o gelatinolíticos, además de los elastolíticos, desempeñan en conjunto, un papel importante en la génesis del enfisema pulmonar inducido por humo de cigarro y ponen en evidencia que el LBA puede constituir un medio que refleje clara y objetivamente parte de los procesos catabólicos ocurridos en el parénquima pulmonar como consecuencia de un incremento en la actividad de proteasas.

INTRODUCCIÓN.

MATRIZ EXTRACELULAR PULMONAR.

El pulmón es un órgano que entre sus múltiples funciones se encarga de la oxigenación y el desecho de los gases que son producto de las reacciones metabólicas que el organismo realiza cotidianamente. En el pulmón, la asociación de un número indeterminado de alvéolos constituyen la unidad funcional para el recambio de gases; en esta unidad denominada acino respiratorio, las paredes de los alvéolos representan la barrera fisiológica para el intercambio de O_2 y CO_2 . En el humano el área de superficie alveolar es de aproximadamente 80 m^2 (Lamb, 1995).

Las características morfofuncionales del pulmón dependen fundamentalmente de la estructura y/o constitución bioquímica de la matriz extracelular, la cual se compone de membranas basales y tejido conectivo intersticial. Sirve entre otras cosas, como soporte estructural de células y tejidos, actúa como barrera física regulando el paso de moléculas y compartamentaliza los tejidos específicos separando el epitelio o el endotelio del intersticio (Turino, 1985). El mantenimiento y la integridad de la estructura de la matriz extracelular determina la eficiencia del proceso respiratorio y por lo tanto de la calidad de vida del organismo.

Las membranas basales están presentes a todo lo largo de las vías aéreas, el epitelio alveolar y en el endotelio vascular. En su mayor parte se componen de colágena tipo IV, moléculas de laminina, entactina, fibronectina, colágena tipo V, además de proteoglicanos y glicosaminoglicanos como el heparan sulfato y el condroitin sulfato. En

las unidades de intercambio gaseoso la membrana basal del epitelio alveolar y el endotelio vascular se fusionan para facilitar el intercambio de gases (Turino, 1985; Yurchenco y Schittny, 1990; Dunsmore y Rannels, 1996).

El intersticio pulmonar está constituido en su mayor parte por fibras de colágena y elastina. Existen también moléculas de fibronectina, laminina y una gran variedad de macromoléculas que conforman una red de proteoglicanos y glicosaminoglicanos que constituyen un microambiente viscoelástico. Embebidas en esta matriz se encuentran varios tipos de células mesenquimatosas que incluyen fibroblastos, miofibroblastos, y pericitos; macrófagos, linfocitos T y B, y algunos leucocitos polimorfonucleares, constituyen las células inmuno/inflamatorias más comunes. Las colágenas y la elastina son las moléculas más importantes que determinan la estructura del pulmón. Moléculas como los proteoglicanos sirven entre otras cosas, como substrato adhesivo para las células, están implicadas en el mecanismo de compresión hidrostática del órgano y en el mantenimiento del volumen de agua tisular (Weibel y Crystal, 1991., Dunsmore y Rannels, 1996).

FAMILIA DE LAS COLÁGENAS.

Estructura.

Las colágenas constituyen una familia heterogénea de al menos 19 proteínas estructurales que están formadas por tres cadenas polipeptídicas conocidas como cadenas α , las cuales derivan de genes específicos. Cada una de las cadenas α contiene uno o más dominios (denominados colagénicos) con una secuencia repetida de residuos de aminoácidos Gly-Xaa-Yaa, en donde X generalmente es ocupado por Pro y Y por OHpro. En la secuencia de aminoácidos de los dominios triple helicoidales la Gly ocupa un sitio más constante (uno de cada tres) y representa el 33% de todos los aminoácidos,

aproximadamente 100 de las posiciones X son Pro y 100 de las posiciones Y son OHpro, otros aminoácidos como la Lys y la OHlys también están presentes pero en menor proporción. El arreglo repetitivo Gly-Pro-OHpro permite la formación de una triple hélice entre las cadenas α y le confiere estabilidad térmica a la molécula (Prockop, *et al.* 1979; Linsenmayer, 1991).

Tipos de colágena.

Las colágenas se pueden clasificar en dos grandes grupos: a) *colágenas fibrilares* que incluye los tipos I, II, III, V, y XI, y b) *colágenas no fibrilares*, que a su vez se subdivide en varias categorías, de las cuales destacan los tipos que forman estructuras reticulares de membranas basales, tipos IV, VIII, y X, además de las colágenas asociadas a fibras: tipos IX, XII, XIV, XVI, y XIX. Existen colágenas como los tipos XIII, y XV-XIX que fueron recientemente descubiertas por secuenciación de cDNA y aún cuando no se tiene una caracterización completa en su forma de proteína, los análisis de mRNA indican que se expresan en varios tejidos (para revisión ver Brown y Timpl, 1995; Prockop y Kivirikko, 1995).

Todos los tipos de colágena varían en el tipo de cadenas α que las componen y se pueden encontrar como homotrimeros formados por tres cadenas $\alpha 1$ idénticas, como en las colágenas tipo II y III que están compuestas por 3 cadenas $\alpha 1(\text{II})$ y $\alpha 1(\text{III})$ respectivamente, o bien se pueden encontrar como heterotrimeros compuestos por una asociación de cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ ó $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$, tal es el caso de la colágena tipo I que se compone por dos cadenas idénticas $\alpha 1(\text{I})$ y una cadena $\alpha 2(\text{I})$; la colágena tipo VI es un tipo poco común que sólo se puede encontrar en la combinación $\alpha 1(\text{VI}) \alpha 2(\text{VI}) \alpha 3(\text{VI})$. En la colágena tipo IV se presentan seis cadenas α homólogas, de la $\alpha 1(\text{IV})$ a la $\alpha 6(\text{IV})$, sin embargo la asociación más común la forman dos cadenas $\alpha 1(\text{IV})$ y una cadena $\alpha 2(\text{IV})$ (Burgeson, 1988; Brown y Timpl, 1995; Prockop y Kivirikko, 1995).

En la matriz extracelular del pulmón las colágenas son sintetizadas principalmente por fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales y mesoteliopleurales además de células tipo II. Estas pueden representar el 15 ó 20 % del peso seco del órgano y entre sus funciones están la de mantener las fuerzas tensiles y evitar el colapso de las unidades de intercambio gaseoso. Las colágenas fibrilares tipo I y III son las más abundantes, también coexisten los tipos V y VI. La colágena de membrana basal tipo IV representa el 5% de la masa total de colágenas (Turino, 1985; Bienkowski, 1991; Weibel y Cristal 1991; Dunsmore y Rannels, 1996).

Biosíntesis.

La síntesis y estructura de las colágenas que forman fibras es similar. Las cadenas α están constituidas por un gran dominio triple helicoidal de ~1000 residuos de aminoácidos con una perfecta secuencia repetida Gly-Xaa-Yaa, y son sintetizadas como precursores de colágena (procolágenas), con propéptidos amino-terminal y carboxi-terminal, adicionales (Brown y Timpl, 1995).

Los genes que codifican para las cadenas α de las procolágenas presentan una estructura compleja. Estos genes varían en tamaño de 15 - 50 Kb y la mayoría tienen más de 50 exones. Además, presentan un gran número de intrones de diversos tamaños; el gen que codifica para el dominio triple helicoidal de las cadenas α tiene 42 exones. La mayoría de los exones tienen 54 pb y 108 pb o se presentan en múltiplos de 9 y cada uno se inicia con un codon que codifica para el aminoácido Gly y termina con el codon para el aminoácido en la posición Y (Kivirikko y Myllylä, 1989; Prockop y Kivirikko, 1995).

La síntesis de las cadenas polipeptídicas se lleva a cabo en ribosomas unidos a membrana y se inicia con la formación de un péptido señal amino-terminal que es removido en su paso por las cisternas del RER. Siguiendo la síntesis inmediata de las

procadenas α , éstas son sujetas de una serie de hidroxilaciones por enzimas específicas (hidroxilasas) que convierten algunos residuos de Pro a 4-OHpro y 3-OHpro, y residuos de Lys a OHlys, de los cuales algunos son glicosilados por adición de galactosa y/o glucosa.

Subsecuentemente ocurre la adición de oligosacáridos ricos en manosa en residuos de Asn en uno o ambos propéptidos amino y carboxi-terminales, y la formación de enlaces disulfuro inter e intracadena en el propéptido carboxi-terminal y sólo intracatenarios en el propéptido amino-terminal; dichos eventos son necesarios para que se dé la formación de la triple hélice, la cual se inicia en la región del propéptido carboxi-terminal, una vez que cada procadena α ha adquirido alrededor de 100 residuos de 4-OHpro y se propaga a manera de “zipper” hacia el propéptido amino-terminal (para revisión ver Prockop, *et al.*, 1979; Kivirikko y Myllyä, 1989; Olsen, 1991).

La procolágena recién sintetizada es transportada hacia el Aparato de Golgi y de ahí es secretada en vesículas hacia el medio extracelular en donde los propéptidos amino y carboxi-terminales son removidos por enzimas específicas para formar moléculas de colágena madura (Linsenmayer, 1991).

La molécula de colágena madura presenta pequeñas secuencias no triple helicoidales en las regiones amino y carboxi-terminales (telopéptidos) y es ahí donde se inicia la formación de los entrecruzamientos entre moléculas para formar las fibras de colágena. La lisil-oxidasa es la enzima responsable de originar los entrecruzamientos por desaminación oxidativa de ciertos residuos de Lys e OHlys que originan la formación de aldehídos entre monómeros de colágena adyacentes, en las regiones triple helicoidales, con lo cual se origina el depósito de colágenas en forma de fibras (Olsen, 1991).

La biosíntesis de las colágenas que no forman fibras prácticamente sigue el patrón descrito en los párrafos anteriores. Sin embargo, existen algunas diferencias que evidentemente responden a las estructuras que pueden formar en diversos tejidos. La colágena tipo IV, el principal componente macromolecular de las membranas basales, es utilizada comúnmente como punto de comparación en este sentido.

Los genes que codifican para las seis cadenas α (IV) se encuentran pareados y orientados cabeza a cabeza compartiendo regiones promotoras, en diferentes cromosomas y sólo unos cuantos exones presentan 54 pb (Prockop y Kivirikko, 1995).

A diferencia de las colágenas fibrilares, la colágena tipo IV presenta una región central triple helicoidal que es ~25% mas larga, con una secuencia de cerca de 1,400 residuos de aminoácidos, que es interrumpida en muchas posiciones por pequeñas secuencias que no forman triple hélice además de que presenta una región amino-terminal, denominado 7S¹ con un pequeño dominio no colagénico y un gran dominio globular carboxi-terminal (NC1) de ~230 residuos de aminoácidos, que no son procesados proteolíticamente. La estructura de los dominios 7S y NC1 en la colágena tipo IV determinan el arreglo supramolecular en las membranas basales; el dominio 7S permite la asociación de dímeros y la región NC1 de tetrámeros además de que se puede asociar a otras moléculas por la región del dominio triple helicoidal lo cual permite la formación de una estructura a manera de maya, característica de membranas basales (Yurchenco y Schittny, 1990; Kühn, 1990).

¹ Por su constante de sedimentación.

FIBRAS ELÁSTICAS.

Estructura

Las fibras elásticas constituyen estructuras altamente estables que consisten de dos componentes (elastina polimérica y microfibrillas o componente microfibrilar), estas fibras se disponen oblicuamente en el pulmón y son responsables de proporcionar las características elásticas del órgano (Turino, 1985; Dunsmore y Rannels, 1996).

La elastina, que es el componente funcional de las fibras elásticas, es una proteína altamente insoluble y en comparación con otras moléculas, en el pulmón representa un porcentaje muy bajo que puede ser aproximadamente del 25% en el humano y del 2% en los roedores (Starcher, 1986).

De los residuos de aminoácidos que conforman el monómero de elastina un tercio son Gly, un noveno Pro y un 40% son de aminoácidos hidrofóbicos como Ala, Val, Leu, e Ile; presenta ~1% de OHPro y no contiene OHLys. Una característica particular de la elastina es que presenta varias secuencias repetidas de aminoácidos no polares (-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Ala- y -Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Lys-), las cuales probablemente determinan las bases fisicoquímicas del comportamiento elástico de la molécula (Starcher, 1986; Mecham y Heuser, 1991).

Las microfibrillas constituyen el componente no elástico de las fibras elásticas y son las responsables directas de su organización; aparecen en etapas tempranas del desarrollo fetal como agregados de fibrillas de 10-12 nm en arreglo paralelo y su proporción en las fibras elásticas decrece con la edad del animal (Mecham, 1991).

Las microfibrillas se constituyen por una GP de 31 kDa denominada MAGP que presenta una región amino-terminal rica en Gln, Pro, y aminoácidos ácidos, además de una región carboxi-terminal con varios residuos de Cys y muchos aminoácidos básicos. Otro de los componentes de las microfibrillas es la fibrilina, una GP de 350 000 Da cuya estructura consiste de grandes regiones ricas en repeticiones con secuencia -Glu-Gly-Phe-, y una secuencia de adhesión celular -Arg-Gly-Asp-. Una proteína de 35 kDa con actividad amino-oxidasa también se asocia al componente microfibrilar (Mecham y Heuser, 1991).

Biosíntesis.

La elastina es sintetizada en su forma de precursor soluble (denominado tropoelastina) por una gran variedad de células que incluyen fibroblastos, miofibroblastos, células mesoteliopleurales, células del músculo liso y condrocitos (Starcher, 1986; Mecham, *et al.* 1991).

El gen que codifica para la molécula de tropoelastina presenta un alto contenido de intrones, respecto a los pocos exones que son muy pequeños (de 27-69 pb), en relación de 15:1. El gen, que tiene un tamaño aproximado de 40 Kb, se transcribe en un mRNA de sólo 3.5 Kb que codifica para una molécula de ~70 000 Da cuyos dominios hidrofóbicos y de entrecruzamiento son el resultado de la traducción de exones alternados que se inician con un codon para Gly, y al parecer este es el sitio clave en el proceso del splicing² alternativo que da variaciones en la secuencia polipeptídica.

Siguiendo la síntesis de tropoelastina en el RER, aparentemente la molécula es sujeta de pocas modificaciones postraduccionales; sólo algunos residuos de Pro son

² Corte y ligado en la remoción de intrones durante el proceso de maduración del pre-mRNA en eucariontes.

hidroxilados, lo cual no afecta la secreción de los monómeros ni la formación de fibras en el espacio extracelular (Parks y Deak, 1990; Rosenbloom, *et al.* 1991).

Fibrilogénesis.

Los monómeros de tropoelastina recién sintetizados son trasladados hacia el espacio extracelular en donde inmediatamente se asocian con las microfibrillas mediante una interacción hidrofóbica. La organización funcional de las fibras elásticas maduras ocurre por interacción entre la tropoelastina y las GP del componente microfibrilar y es mediada por una proteína de membrana (receptor de elastina) de 67 kDa que presenta un sitio de unión que reconoce la secuencia -Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly- en la molécula de elastina y otro sitio que reconoce carbohidratos. Cuando la afinidad de unión es más fuerte en el sitio que reconoce carbohidratos, la molécula de tropoelastina se transfiere a algún sitio de ensamblaje en las microfibrillas con lo cual se inicia el proceso de fibrilogénesis, mediante la acción de la enzima lisil-oxidasa, que cataliza la conversión de 5 ó 6 residuos de Lisina en "al-Lys" por desaminación oxidativa; estos residuos posteriormente se condensan por reacciones espontáneas y permiten la formación de dos aminoácidos (Des e Ide) que constituyen los enlaces covalentes de la fibra de elastina madura y que sirven como marcadores bioquímicos en el metabolismo de la elastina (Mecham, *et al.* 1991; Ramos, *et al.* 1996).

DEGRADACIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR PULMONAR.

La degradación ordenada de los componentes de la matriz extracelular es un evento fundamental que gobierna los procesos de crecimiento, desarrollo, morfogénesis, remodelación y reparación bajo condiciones normales. Uno de los aspectos más importantes de los procesos inflamatorios es la degradación excesiva de la matriz extracelular que es consecuencia del incremento en el flujo de células inflamatorias y

aumento de la síntesis de enzimas que degradan tejido intersticial y membranas basales (Werb y Alexander, 1993).

PROTEASAS

Las enzimas más importantes que degradan componentes de la matriz extracelular en el pulmón son proteinasas que se unen a los enlaces de las cadenas polipeptídicas propiciando su rompimiento. La mayoría de estas proteasas son secretadas principalmente por neutrófilos pero también los macrófagos, los basófilos, las células cebadas, y los fibroblastos secretan proteasas (Hubbard, *et al.* 1991).

Los neutrófilos constituyen las células inflamatorias más importantes en muchos padecimientos que implican daño a los componentes de la matriz extracelular debido a que poseen una gran variedad de proteasas. La mayoría de estas enzimas se encuentran guardadas en forma inactiva en gránulos que se encuentran en el citoplasma de la célula y son descargadas al medio extracelular cuando ocurren mecanismo de fagocitosis o cuando la célula muere (Travis, *et al.* 1991).

En los procesos de degradación de matriz extracelular, está implícita la participación conjunta de varias enzimas (Werb y Alexander, 1993). Por ejemplo, metaloproteinasas de matriz extracelular como la colagenasa intersticial, las gelatinasas³ A y B, estromelisin, etc. Estas enzimas presentan un sitio catalítico dependiente de zinc, con gran afinidad por sustratos como colágenas nativas y desnaturalizadas, además de que también degradan elastina, proteoglicanos, fibronectina y laminina (Matrisian, 1992); proteasas de serina y cisteína como la elastasa de neutrófilos, la proteinasa 3, las catepsinas G y B, entre otras, que aunque degradan colágenas y otras moléculas, tienen mayor actividad sobre elastina (Hubbard, *et al.* 1991; Werb y Alexander, 1993).

³ Conocidas también como colagenasas tipo IV de 72 y 92 kDa respectivamente.

Metaloproteinasas de matriz.

Las MMPs constituyen una familia de endopeptidasas que para su actividad dependen de la presencia de iones de zinc en su sitio catalítico, y su actividad óptima ocurre a pH fisiológico; todas ellas están relacionadas con la colagenasa intersticial (MMP-1) que representa el prototipo de esta familia de enzimas que tienen la capacidad de unirse y degradar componentes de la matriz extracelular, principalmente colágenas nativas y desnaturalizadas (Murphy y Docherty, 1992).

Las MMPs están constituidas al menos por 11 miembros divididos en 4 grupos con pesos moleculares que oscilan entre los 28000-92000 Da en algunas de ellas la secuencia de DNA se tiene bien definida para el humano y están parcialmente caracterizadas en otras especies animales e incluyen (Senior, *et al.* 1989; Matrisian, 1992; Woessner, 1991, 1994; Birkerdal-Hansen, 1995):

Colagenasas: La colagenasa intersticial (MMP-1) derivada de un gran número de células, preferentemente fibroblastos y macrófagos, la colagenasa de neutrófilos (MMP-8), y la recién descubierta colagenasa intersticial (MMP-13) derivada de carcinoma de mama. Estas enzimas degradan preferentemente colágenas intersticiales tipos I, II, y III.

Gelatinasas: La gelatinasa A ó colagenasa tipo IV de 72 kDa (MMP-2) y la gelatinasa B de 92 kDa (MMP-9) degradan predominantemente colágena tipo IV y V además de gelatina (colágena desnaturalizada).

Estromelisininas: Las estromelisininas 1-3 (MMP-3, MMP-10 y MMP-11) respectivamente, la denominada metaloelastasa de macrófagos (MMP-12), y la matrilisina (MMP-7). Estas enzimas actúan sobre todo en fibronectina, laminina, y colágena tipo IV, y en el caso de la MMP-12 se ha reportado que degrada exclusivamente elastina.

MMP tipo membrana: La MT- MMP ó MMP-14 que actúa sobre la progelatinasa A.

Las características fundamentales que comparten todas las MMPs son (Matrisian, 1992; Woessner, 1991, 1994) :

- El mecanismo de activación depende de la presencia de zinc en el sitio activo, este zinc es quelado por 1,10-fenantrolina o EDTA en el átomo catalítico.
- Son secretadas al medio extracelular en forma de zimógenos o proenzimas.
- La proenzima puede ser activada por otras proteinasas o por organomercuriales y la activación se acompaña por la pérdida de un fragmento de ~10 kDa.
- Las enzimas muestran alta homología con la secuencia de cDNA de la colagenasa (MMP-1) y se unen a uno o más componentes de la matriz extracelular.
- La actividad es inhibida por inhibidores tisulares de metaloproteinasas TIMP-1, TIMP-2, y TIMP-3.

CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA DE MMPs*.

<i>Enzima</i>	<i>Mr (Da)</i>	<i>MMP#</i>	<i>Substratos</i>
COLAGENASAS			Colágenas tipos I, II, III, VII, VIII, X
Colagenasa tipo-fibroblasto	52 000	MMP-1	
Colagenasa tipo PMN	75 000	MMP-8	
Colagenasa -3	52 000	MMP-13	
GELATINASAS			Colágenas tipos IV, V, VII, X. Gelatinas, fibronectina y elastina.
Gelatinasa A	72 000	MMP-2	
Gelatinasa B	92 000	MMP-9	
ESTROMELISINAS			Colágenas tipos IV, V, IX, y X. Gelatina, fibronectina, laminina, proteína "core" de proteoglicanos.
Estromelisina-1	55 000	MMP-2	
Estromelisina-2	55 000	MMP-10	
Estromelisina-3	61 000	MMP-11	
Metaloelastasa de macrófagos	54 000	MMP-12	Elastina
Matrilisina	28 000	MMP-7	
TIPO MEMBRANA			
MMP-tipo membrana	63 000	MMP-14	Progelatinasa A

* Birkedal-Hansen (1995).

La estructura de la MMP-1 derivada de fibroblastos representa el diseño básico en las MMPs (Fig. A). El zimógeno presenta una secuencia de aminoácidos dividida en varios dominios claramente distinguibles, contiene:

Un *dominio propeptídico* de 8-10 kDa que a sobreactivación pierde su péptido señal (un pequeño fragmento de 17 residuos de aminoácidos); la función de este propéptido es mantener la latencia de las MMPs mediante un mecanismo de “switch” que involucra la acción coordinada del residuo Cys⁷³ (en una secuencia altamente conservada -Pro-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Asp-Gly-) con el átomo de zinc en el sitio activo (Woessner, 1994).

El *dominio catalítico* presenta una secuencia conservada (-His-Glu-x-Gly-His-) e incluye un *dominio de unión a zinc*. Se reconocen dos sitios de unión al Zn²⁺, el primero “Zn²⁺ estructural” se encuentra en interacción con los residuos de His 149,154 y 179; el segundo “Zn²⁺ catalítico” se encuentra interaccionando con los residuos de His 199, 203 y 210; es en este último en donde se lleva a cabo la actividad proteolítica contra substratos y la inhibición de la actividad quelando al zinc. Con excepción de la MMP-7, el resto presentan un dominio Carboxi-terminal con 3 o 4 secuencias repetidas similares a la hemopexina/vitronectina, conectadas por un puente disulfuro entre los residuos Cys²⁵⁹ y Cys⁴⁶⁶, que ayuda a reconocer el substrato (Murphy y Docherty, 1992; Woessner, 1994).

Las gelatinasas A y B a diferencia de las otras MMPs presentan un dominio de fibronectina que separa al dominio catalítico y tiene una secuencia similar al dominio de unión de fibronectina a colágena; por otra parte, un dominio similar a la colágena tipo V se encuentra exclusivamente en la gelatinasa B, lo cual la hace ser la de mayor peso molecular (Matrisian, 1992).

DOMINIOS COMPARTIDOS ENTRE LAS MMPs

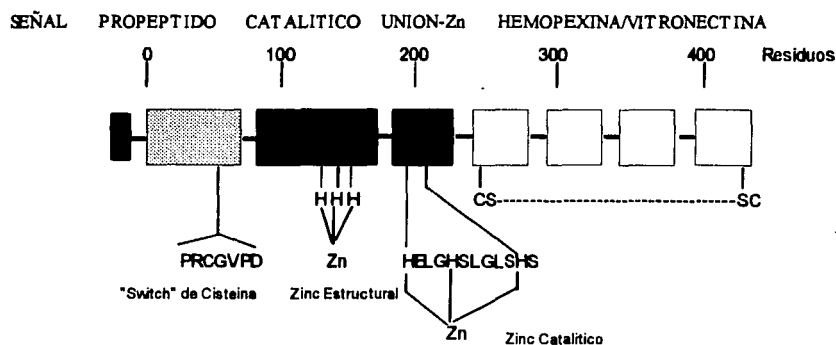


Figura A. Estructura de los dominios de la colagenasa de fibroblasto. En la escala de residuos sobresalen las siguientes posiciones: Cys72 en el "switch" de cisteína; His-149, -164 y -179 para el zinc estructural; His-199, -203 y -210 para el zinc catalítico; y Cys-259 y -466 para el puente disulfuro. Los ligandos al zinc están colocados por analogía con la estromelina-1 (Woessner, 1994).

La regulación de las MMPs puede ocurrir a varios niveles (Woessner, 1991; Matrisian, 1994; Birkedal-Hansen, 1995):

A nivel transcripcional los genes de algunas MMPs pueden ser inducidos por citocinas y/o factores de crecimiento (IL-1, TNF- α , TGF- α , EGF, FGF y PDGF), interferones (α , β y γ), agentes como la colchicina, pentoxifilina, factores de acción celular como la concavalina A, entre otros. El TGF- β , IL-4, estrógenos y progesterona son agentes que pueden reprimir a algunos genes de MMPs.

Se ha propuesto que en fibroblastos existe un factor específico que es inducido por EGF, que regula la estabilidad del mRNA de la colagenasa intersticial y la estromelisina 1; por otro lado, el TGF- β 1 puede incrementar la estabilidad de mRNA de la MMP-2.

A nivel de secreción y activación las MMPs son reguladas a través del dominio propeptídico, mediante el mecanismo de "switch de cisteína". En algunos casos como en las procollagenasas de fibroblastos, neutrófilos y las proestromelisininas 1 y 2, los propéptidos presentan zonas de rompimiento para enzimas como la plasmina y la tripsina; el rompimiento desestabiliza la interacción entre el residuo de Cys⁷³ y el Zn²⁺ y la conformación de la proteína cambia, permitiendo así el proceso autocatalítico hacia la forma activa. En el caso de la progelatinasa A, la activación se puede llevar a cabo en la superficie celular a través de la MT-MMP.

Extracelularmente a nivel de forma activa, la actividad de las MMPs, aparte de ser inhibidas por el inhibidor α_2 -M, también es inhibida por proteínas específicas conocidas como TIMPs. Estos inhibidores se unen fuertemente en proporción de 1:1 con las formas activas de MMPs y forman un complejo inhibidor-enzima altamente acoplado y específico. Se conocen tres tipos de TIMPs que han sido indentificados y clonados en

varias especies: El TIMP-1 es una GP que tiene una *Mr* 28.5 kDa, el TIMP-2 y el TIMP-3 han sido aisladas sólo en su forma no glicosilada con *Mr* 21 kDa. El TIMP-1 y el TIMP-2 son secretados por varias células y se encuentran en fluidos corporales y extracto de tejidos; el TIMP-3 es el único que se encuentra exclusivamente asociado con matriz extracelular en forma insoluble (Willenbrock y Murphy, 1994).

Las moléculas de TIMPs consisten de 184-194 residuos de aminoácidos y entre ellas sólo muestran cerca del 40% de homología en sus secuencias de aminoácidos. La proteína consta de un dominio Amino-terminal y un Carboxi-terminal; la presencia de 12 residuos de Cys altamente conservados permite la formación de puentes disulfuro que son esenciales para mantener la estructura terciaria de la molécula, además de que permiten la formación de asas o "loops". El dominio Amino-terminal contiene de 1-3 asas y el Carboxi-terminal de 4-6 más pequeños. La interacción de la molécula con el dominio catalítico de las MMPs se lleva a cabo vía Amino-terminal, sin embargo para la gelatinasa A, las interacciones iónicas del dominio Carboxi-terminal, son también importantes para la formación del complejo (para revisión ver Willenbrock y Murphy, 1994; Birkerdal-Hansen, 1995).

Elastasa de neutrófilos.

La elastasa de neutrófilos es una proteasa de serina que se encuentra en los gránulos azurofilicos o primarios y constituye la principal proteasa implicada en la degradación de las fibras elásticas maduras (Janoff, 1985; Snider, *et al.* 1991; Travis, 1991). La síntesis de esta enzima ocurre cuando la célula se encuentra en estados inmaduros, preferentemente en el estado de promielocito y es codificada por un gen de ~4 Kb que se encuentra en el cromosoma 11. La proteína inmadura, que consta de una cadena de 267 residuos de aminoácidos es producto de la traducción de 5 exones; este precursor inactivo es glicosilado con complejos carbohidratos y transportado al Aparato

de Golgi en donde finalmente es empaquetada como una GP de cadena simple con 220 residuos de aminoácidos y con un peso molecular de ~33 kDa. Alrededor del 20% de la molécula madura se encuentra carbohidratada en los residuos de Asn⁹⁵ y Asn¹⁴⁴, presenta 4 enlaces disulfuro intramoleculares y tiene un alto contenido de residuos de Arg, lo cual la hace ser una proteína muy básica (Janoff, 1985., Hubbard, *et al.* 1991., Turino, 1991).

Los residuos His⁴¹ - Asp⁸⁸ - Ser¹⁷³ conforman el sitio catalítico de la elastasa de neutrófilos. Una transferencia de electrones del residuo Asp⁸⁸ al oxígeno γ del residuo Ser¹⁷³ es responsable de que la enzima pueda hidrolizar el enlace peptídico del sustrato (Hubbard, *et al.* 1991).

La catepsina G y la proteinasa-3 son otras proteasas de serina que también son secretadas por los neutrófilos y su mecanismo de activación semeja al de la elastasa de neutrófilos, sin embargo esta última se encuentra en proporciones más altas dentro de la célula y tiene mayor afinidad y cinética enzimática sobre su sustrato, principalmente sobre elastina (Travis, *et al.* 1991; Werb y Alexander, 1993).

La α_1 -AT, una GP de ~52 kDa, representa el principal inhibidor de proteasas en suero y en el pulmón; es sintetizada primordialmente por hepatocitos y localmente puede ser secretada por macrófagos y neutrófilos. Esta proteína (con una cadena polipeptídica de 394 residuos de aminoácidos) es el principal inhibidor de las proteasas de serina, incluyendo a la tripsina, sin embargo su mayor actividad se ve reflejada en la elastasa de neutrófilos con la cual forma un complejo altamente específico 1:1 a través de la interacción de los residuos Met³⁵⁸-Ser³⁵⁹ que representan el sitio activo de la α_1 -AT con el sitio reactivo de la elastasa de neutrófilos (para revisión ver Evans y Pryor, 1994).

ENFISEMA PULMONAR.

El hábito de fumar cigarros y la exposición al humo derivado de su combustión, constituyen un grave problema de salud pública a nivel mundial ya que este humo causa innumerables efectos deletéreos en la salud de los individuos que son fumadores activos y pasivos. Se ha demostrado que el humo de cigarro es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de enfermedades pulmonares obstructivas y crónicas, como el enfisema y la bronquitis crónica (Janoff, *et al.* 1987; Higgins, 1991), además de que también puede generar otros padecimientos graves como, cáncer pulmonar y varios tipos de neoplasias, alteraciones cardiovasculares, inmunológicas, entre otras (Rubio y Fabian, 1995).

Definición.

El enfisema pulmonar es un padecimiento que se caracteriza por el agrandamiento de espacios aéreos y se acompaña de la ruptura de paredes alveolares (Snider, *et al.* 1986). Actualmente se pueden distinguir varios tipos de enfisema pulmonar. El centroacinar es el tipo más común y se asocia con el hábito de fumar cigarros. El daño proteolítico involucra la región central del acino junto con porciones cercanas a los bronquiolos respiratorios primarios; el tipo panacinar se presenta en individuos con deficiencia en suero del inhibidor de proteasas α_1 -AT y la lesión afecta uniformemente a todos los componentes del acino. Otros tipos como el paraseptal y el irregular son menos comunes (Snider, *et al.* 1985, 1986; Lamb, 1995).

Independientemente de su etiología, en todos los tipos de enfisema se originan cambios que conducen a una obstrucción del flujo de aire, como consecuencia de la pérdida de área de intercambio de gases, del colapso de vías aéreas y el decremento de la capacidad elástica, lo cual se traduce en la presencia de disneas y disminución de la capacidad de difusión de gases (Snider, *et al.* 1985; Turino, 1991; Lamb, 1995).

Causas (Hipótesis Proteasas-Antiproteasas).

Los factores que se asocian con el desarrollo de un proceso enfisematoso pueden ser de carácter demográfico, ambiental o hereditario (Higgins, 1991; Lamb, 1995). En los factores demográficos se pueden incluir, entre otros, a la edad, el sexo y estatus socioeconómico; los ambientales están referidos a la inhalación de gases, humos y/o partículas suspendidas, como dióxidos de nitrógeno y humo de cigarro. De los factores determinados por la herencia, la condición homocigota (ZZ) para el gen que codifica la α_1 -AT se asocia con el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, este fenotipo se presenta en un pequeño porcentaje de la población (Higgins, 1991; Turino, 1991).

Durante mucho tiempo la génesis de la enfermedad se explicó en términos de una obstrucción de bronquiolos, de la dilatación de alvéolos y ruptura de paredes alveolares. En la década de los 60s, dos eventos por separado condujeron al desarrollo de una nueva hipótesis. Por un lado, se estableció que sujetos con deficiencia en suero de α_1 -AT, presentaban una asociación con obstrucción crónica del flujo de aire y con enfisema del tipo panacinar; más tarde se pudo comprobar que la instilación de una enzima con actividad elastolítica en animales, era capaz de producir alteraciones pulmonares similares a las descritas para el enfisema humano (Snider, 1992; Evans y Pryor, 1994).

La hipótesis del desequilibrio Proteasas-Antiproteasas, constituye hasta nuestros días la más aceptada para explicar la génesis del enfisema y de otros padecimientos que implican daño proteolítico a la matriz extracelular. El concepto detrás de esta hipótesis sugiere que en los individuos con daño proteolítico pulmonar se da un desequilibrio que apunta a favor de la producción de enzimas que son capaces de degradar los principales componentes de la matriz extracelular, mientras que por otro lado, la acción de las moléculas encargadas de inhibir la acción de estas proteasas se ve disminuida (Janoff, 1985; Gadek y Pacht, 1990; Evans y Pryor, 1994; Stockley, 1995).

Un desequilibrio entre elastasas y antielastasas han marcado la conceptualización de la teoría Proteasas-Antiproteasas, ya que se había establecido que sólo las enzimas que son capaces de degradar elastina pueden originar un proceso enfisematoso (Janoff, 1985); sin embargo, esta teoría comienza a cambiar radicalmente, ya que se ha sugerido que existen otras enzimas, como la colágenasa intersticial, que puede generar enfisema pulmonar (D'Armiento, *et al.* 1992; Selman, *et al.* 1996).

CONSECUENCIAS DEL HÁBITO DE FUMAR CIGARROS.

Se tiene un amplio conocimiento acerca de la química y de los efectos biológicos producidos por el humo de cigarro (Pryor, 1992). Se ha considerado que este humo es el factor etiológico más importante para la génesis de un desequilibrio Proteasas-Antiproteasas y por lo tanto para el desarrollo de enfisema pulmonar (Janoff, *et al.* 1987; Higgins, 1991; Turino, 1991; Evans y Pryor, 1994).

Actualmente, se han podido identificar en el humo de cigarro más de 4,500 compuestos diferentes, tanto en su fase de partículas ó "tar", así como en su fase gaseosa. En la fase de gas están presentes radicales inorgánicos como el NO, que es fuente de alkali-radicales, oxi-radicales, y peroxil-radicales, que son especies altamente reactivas y con periodos de vida muy cortos. En contraste con la fase de gas, en la de "tar" se presentan radicales muy estables y con periodos de vida muy largos, el principal componente en esta fase es un sistema redox de hidroxiquinona-semiquinona-quinona, capaz de producir radicales hidroxilo (Pryor, 1992; Evans y Pryor, 1994).

La presencia de las especies oxidantes en el pulmón producen un ambiente de stress oxidativo, que se refleja en el incremento y activación de células inflamatorias; cuando estas células (macrófagos y neutrófilos) se activan, secretan oxidantes como

superóxidos, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Janoff, *et al.* 1987, Sibille y Reynolds, 1990). *In vivo* e *in vitro* el humo de cigarro es capaz de inducir un acúmulo de macrófagos activados en los bronquiolos respiratorios, los cuales secretan quimioatrayentes para neutrófilos (Campbell, *et al.* 1987; Janoff, *et al.* 1987), con lo cual se incrementa el daño proteolítico, ya que estas células constituyen la mayor fuente de proteasas en el pulmón (Sibille y Reynolds, 1990; Hubbard, *et al.* 1991; Shapiro, *et al.* 1991).

Estudios *in vitro* han demostrado claramente que el humo de cigarro puede inactivar a la α_1 -AT por oxidación del residuo Met³⁵⁸, en el sitio catalítico de la molécula, reduciendo de 1,000 a 2,000 veces su actividad inhibitoria contra la elastasa de neutrófilos (Evans y Pryor, 1994).

ANTECEDENTES.

MODELOS ANIMALES DE ENFISEMA PULMONAR.

La mayor parte del cuerpo de evidencias respecto a la génesis del enfisema pulmonar ha resultado del estudio en modelos animales. En este contexto se ha sugerido que la elastasa de neutrófilos y la α_1 -AT, son las moléculas más importantes para el desarrollo de la enfermedad (Janoff, 1985) y por ende, la mayoría de los modelos implementados se han enfocado a su estudio.

Los modelos más representativos consisten de la instilación de enzimas elastolíticas dentro del pulmón de animales experimentales, sin embargo sólo con la elastasa de neutrófilos y la elastasa pancreática se ha logrado mantener la mejor reproducibilidad de una condición enfisematosa. La exposición a sales de cadmio, óxidos de nitrógeno y humo de cigarro son ejemplos de modelos que intentan probar los efectos de estas partículas

contaminantes. En otro tipo de modelos, denominados como genéticos, se ha logrado reproducir cambios enfisematosos por sobreexpresión de enzimas elastolíticas, inhibiendo la síntesis y/o expresión de α_1 -AT, o bien inhibiendo la expresión y actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de la elastina, como la lisil-oxidasa (para revisión ver Snider, *et al.* 1986 y 1991; Cantor y Turino, 1993).

Modelos inducidos con humo de cigarro.

Existen pocos modelos de enfisema inducidos por la inhalación de humo de cigarro y ésto es debido a que los modelos implementados en ratas y hámsters han fallado constantemente en reproducir una condición enfisematosa (Snider, *et al.* 1991).

Recientemente Wright y Churg (1990) utilizando cobayos expuestos al humo de 10 cigarrillos/día, 5 días por semana, durante 1, 3, 6, y 12 meses lograron obtener alteraciones morfológicas y fisiológicas progresivas que concuerdan con cambios enfisematosos. Dichos cambios fueron más evidentes en los animales expuestos durante 12 meses. Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto que el humo de cigarro es capaz de inducir alteraciones enfisematosas reproducibles en estos animales de laboratorio.

En el ámbito de los mecanismos de degradación de componentes de la matriz extracelular, los estudios realizados se han enfocado básicamente a esclarecer el papel de la actividad de las elastinas y a la presencia de productos resultantes de la degradación de elastina, como indicadores del daño producido al parénquima pulmonar (Janoff, 1985; Luisetti, *et al.* 1993). No obstante, aún cuando las colágenas son las moléculas más abundantes de la matriz extracelular del pulmón (Turino, 1985; Weibel y Cristal, 1991; Dunsmore y Rannels, 1996), los trabajos que hacen referencia al estudio de las enzimas encargadas de degradar a las colágenas y de los productos resultantes de su degradación son escasos.

D'Armiento *et al.* (1992) utilizando un modelo de ratón transgénico para la colagenasa humana demostraron que la expresión de esta enzima origina cambios destructivos en la arquitectura alveolar definidos como alteraciones enfisematosas, además encontraron que estos cambios se acompañan de una pérdida de fibras de colágena, pero no de elastina.

Becerril (1995) evaluó la actividad elastolítica de macrófagos alveolares y macrófagos del intersticio pulmonar en cobayos expuestos al humo de 20 cigarros/día, 5 días por semana, durante un periodo de 6 semanas. Los resultados de este estudio demostraron que los animales expuestos a humo de cigarro producen lesiones enfisematosas caracterizadas por cuadros inflamatorios y ruptura de paredes alveolares. Por otro lado, el estudio demostró que existe un incremento en la actividad elastolítica de los macrófagos alveolares e intersticiales de los animales expuestos a humo de cigarro comparados contra animales no expuestos (controles), sugiriendo que los macrófagos pueden degradar elastina y que esta actividad se ve incrementada con la exposición al humo de cigarro.

En un estudio morfológico y bioquímico Selman *et al.* (1996) utilizando cobayos expuestos a 20 cigarros/día, 5 días a la semana, por periodos de 1, 3, 4, 6 y 8 semanas, encontraron un incremento significativo en la actividad colagenolítica del parénquima pulmonar de los cobayos expuestos durante 4, 6, y 8 semanas, comparado contra los animales controles. Así mismo, encontraron una relación directa entre la actividad colagenolítica y el daño producido al parénquima pulmonar medido como Índice Destructivo. Además de estos hallazgos, se evidenció un incremento en la expresión de colagenasa intersticial por macrófagos, células alveolares y epiteliales adyacentes a las áreas de inflamación. Los resultados de este estudio sugieren que un incremento en la degradación de colágena por colagenasa intersticial puede desempeñar un papel

importante en el desarrollo de un proceso enfisematoso y que el modelo desarrollado representa una buena fuente para abordar el problema de los procesos involucrados en la génesis del enfisema.

Durante mucho tiempo el lavado broncoalveolar (LBA) ha constituido un recurso indispensable que provee una excelente fuente para el estudio de patologías que involucran daño proteolítico a la matriz extracelular pulmonar (Henderson, 1988). En el contexto de los modelos animales utilizados para el estudio de la génesis del enfisema pulmonar inducido por humo de cigarro, no se tienen reportes acerca del comportamiento proteolítico evaluado en el LBA. Además se desconoce, si la actividad de enzimas gelatinolíticas y la presencia de colágena soluble, pueden ser fenómenos evidenciados en el LBA de animales expuestos a humo de cigarro, con lo cual surge la importancia de establecer si el LBA constituye un recurso que refleje de manera indirecta los incrementos de actividad proteolítica en el tejido pulmonar reportados con anterioridad.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar los niveles de actividad de proteinasas que degradan moléculas de la matriz extracelular en el fluido de lavados broncoalveolares (LBA) de cobayos expuestos y no expuestos a humo de cigarro.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Realizar un conteo celular en los LBA de estos animales.
- Evaluar el nivel de actividad elastolítica en el fluido de los LBA.
- Evaluar los niveles de actividad de las gelatinasas de 72 y 92 kDa en los LBA.
- Cuantificar el contenido de proteína total y colágena soluble en los LBA.

HIPÓTESIS.

El humo de cigarro es capaz de incrementar los niveles de enzimas que degradan elastina y colágenas; así mismo, induce un incremento en la actividad colagenolítica en el parénquima pulmonar. Este fenómeno se podría reflejar en las concentraciones de colágena en el fluido de los LBAs de animales expuestos a humo de cigarro en comparación con los LBA de animales no expuestos, así como en los niveles de actividad elastolítica y gelatinolítica.

MATERIAL Y MÉTODOS.

MODELO EXPERIMENTAL.

Se utilizaron cobayos Hartley hembras de dos meses de edad, con un peso aproximado de 450 g, mantenidos bajo condiciones convencionales dentro de un albergue para animales, alimentándose *ad libitum*, intercalando una dieta a base de croquetas Purina[®], alfalfa desinfectada y agua esterilizada por autoclave.

Para el desarrollo del modelo, los animales se dividieron en 5 grupos experimentales, cada uno con 8 animales. Como controles se utilizaron lotes de 6 cobayos del mismo peso y sexo, para cada uno de los grupos experimentales.

EXPOSICIÓN DE LOS ANIMALES AL HUMO DE CIGARRO.

Los cobayos de los grupos experimentales se expusieron al humo producido por la combustión de 20 cigarrillos comerciales (Marlboro 100'S) por día, 5 días a la semana, durante 1, 3, 4, 6, y 8 semanas. Los animales se colocaron dentro de una cámara de exposición (caja de acrílico de 80 x 40 x 30 cm.) sellada perfectamente. Uno de los costados de la caja presentaba dos orificios en donde se colocaban los cigarrillos encendidos - sin filtro - mientras que por la tapa de la caja se conectaba una manguera de látex que aplicando vacío permitía que el humo de los cigarrillos entrara al interior de la cámara. Diariamente se llevaron a cabo 5 exposiciones consecutivas al humo de cigarrillo por periodos de 30 minutos, con intervalos de 30 minutos de descanso⁴ entre cada una de las exposiciones. Los animales de los grupos controles fueron expuestos a aire corriente filtrado.

⁴ Durante el intervalo de descanso, los animales experimentales fueron expuestos a aire corriente filtrado.

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.

Una vez que se terminó el tiempo de exposición para cada uno de los grupos experimentales y controles respectivos, los animales fueron sacrificados y tratados de la siguiente manera:

Cada uno de los cobayos se anestesió con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (0.8ml / kg). Posteriormente se realizó una traqueotomía y se introdujo una cánula estéril de 3 mm de diámetro, a través de la cual se instilaron con jeringas hipodérmicas estériles, 3 alícuotas de 8 ml de SSF al 0.9 %, estéril y a 37 °C; inmediatamente cada una de las alícuotas se aspiró suavemente y el recuperado de las tres se transfirió a tubos estériles que se guardaron en hielo hasta obtener los lavados de todos los animales experimentales y controles.

Para separar los componentes celulares, las muestras de LBA se centrifugaron a 1,500 r.p.m durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga clínica (Beckman GS-6R). El sobrenadante de cada muestra se transfirió a otro tubo y se guardó a -70 °C para su análisis bioquímico posterior. El precipitado de cada muestra se resuspendió con 1 ml de SSF y se realizó un conteo de células totales con un hemocitómetro. El componente celular fue nuevamente centrifugado y las células se fijaron con alcohol etílico al 50% y 2% de carbowax (polietilen-glicol 50%), las muestras se tiñeron con H-E y se utilizaron para un conteo diferencial de células recuperadas.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

Después de obtener el LBA, se disecó la caja torácica para dejar al descubierto los pulmones, el corazón se seccionó a la altura de las aurículas y por la arteria pulmonar se

introdujo una manguera estéril de 3 mm de diámetro, con la finalidad de lavar los pulmones perfundiendo ~50 ml de buffer de fosfatos pH 7.4 a una presión constante de 20 cm de agua. Una vez lavado, el pulmón se fijó con 10 ml de formalina al 10% por vía intratraqueal a una presión de 4 cm H₂O con ayuda de un aparato para perfusión (Orion-362, Sage™ Instruments).

Los pulmones de todos los animales experimentales y controles se procesaron con técnicas histológicas convencionales para microscopía de luz. Para evaluar el tejido pulmonar, se utilizaron cortes de 3-5 µm de grosor teñidos con H-E. Se tomaron como parámetros cualitativos el grado y tipo de inflamación, así como la ruptura de paredes alveolares y la presencia de clavos de retracción⁵ como principal indicador del daño.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO.

CONTENIDO DE PROTEÍNAS.

La concentración de proteína en cada una de las muestras de fluido de los LBA se determinó utilizando el método de Bradford (1976). Se preparó una curva estándar con albúmina bovina [1 mg / ml] en buffer Tris - HCl pH 7.8. De las muestras se tomaron 10 µl y se llevaron a un volumen de 0.8 ml con Tris-HCl pH 7.8, después se agregaron 0.2 ml de reactivo de Bradford concentrado. Las muestras se agitaron en el vortex y pasados 5 minutos a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman, DU® Series 600). La concentración de proteína de cada una de las muestras se obtuvo mediante la curva estándar ajustada por regresión lineal. Los resultados se expresaron como miligramo de proteína por mililitro de fluido del LBA (mg / ml).

⁵ Estructura en forma de porra que se forma por la ruptura enzimática de paredes alveolares.

CONTENIDO DE COLÁGENA.

Se realizó la determinación de hidroxiprolina en las muestras, como marcador bioquímico de la presencia de colágena, con la técnica descrita por Rojkind y González (1974), con algunas modificaciones.

Se tomaron 2 ml del fluido de los LBA y se hidrolizaron con un volumen igual de HCl [12 N] a 75 °C durante 72 horas. Pasado este tiempo las muestras se filtraron utilizando papel filtro (Whatman # 1) y se evaporaron para eliminar el excedente de HCl en una evaporadora Evapomix (HaakeBuchler, Inc.). Una vez evaporadas, las muestras se neutralizaron y se llevaron a un volumen de 2 ml con agua destilada.

Se preparó una curva estándar de 1 a 8 µg de hidroxiprolina / 2ml ; tanto a las muestras de la curva como a las muestras problema se les añadió 1 ml de cloramina T para oxidar la hidroxiprolina. Transcurridos 20 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo adicionando 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2M. Se adicionaron 1 ml de hidróxido de sodio 1 M y 2 g de cloruro de sodio cristalino y las muestras se pusieron en un baño de agua a ebullición por espacio de 30 min. con el objeto de transformar la hidroxiprolina oxidada a su forma pirrólica.

Para separar a la hidroxiprolina de la fase acuosa, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les agregaron 3 ml de tolueno, agitando fuertemente en vortex durante 30 seg. Una vez separado se tomó 1 ml de tolueno y se agregaron 4 ml del reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído al 20%) preparado con alcohol absoluto y HCl 12N para formar un cromóforo. Pasados 30 minutos a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia de las muestras a λ 560 nm en un espectrofotómetro (Beckman, DU® Series 600).

El valor de la concentración de hidroxiprolina en las muestras problema se determinó mediante una regresión lineal de la curva estándar. Para expresar los resultados como contenido de colágena, los valores de hidroxiprolina se multiplicaron por el factor 7.23, que es indicativo del porcentaje de OHpro en colágenas. Los resultados obtenidos se expresaron como microgramos de colágena por mililitro de fluido de LBA ($\mu\text{g} / \text{ml}$).

ACTIVIDAD ELASTOLITICA.

Para evaluar la actividad de enzimas que degradan elastina se utilizó el método descrito por Senior *et al.* (1989), con algunas modificaciones.

Se utilizaron cajas de cultivo (Cluster COSTAR) de 24 pozos de 16 mm de diámetro. En cada uno de los pozos se agregaron 360 μg de elastina marcada con [^3H], en suspensión (15 μl)⁶ que se obtuvo de ligamento de nuca de bovino con una actividad específica de ~243 000 cpm y se extendió uniformemente en la base de los pozos; las cajas se dejaron secar durante 24 horas a 45 °C antes de ser utilizadas.

En cada pozo se agregó 1 ml de fluido de LBA sin concentrar y se dejó incubando por espacio de 24 horas a 37 °C. Por cada ensayo se utilizaron como blancos pozos en los que sólo se añadió 1 ml de SSF. Después de la incubación, las muestras se transvasaron a tubos eppendor y se centrifugaron durante 10 minutos en una Microfuga- E™ (Beckman Instruments). Del sobrenadante de cada muestra se tomó una alícuota de 0.1 ml y se mezcló con 10 ml de líquido de centelleo (AQUASOL-2®). La actividad elastolítica se determinó midiendo las cpm liberadas al medio en un contador de centelleo líquido (Beckman LC-100C). Este análisis se desarrolló por duplicado.

⁶ 1 μl de solución contiene 24 μg de elastina marcada con [^3H].

La actividad en cada muestra fue corregida respecto al valor promedio de las cpm de las muestras que sirvieron como blancos. Los valores ya corregidos se multiplicaron por la cantidad de elastina marcada con [^3H] con la que se plaquearon los pozos y se dividió entre la actividad específica de la misma. Los resultados se expresaron como microgramos de elastina degradada por mililitro de fluido de LBA ($\mu\text{g} / \text{ml}$).

ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA.

La actividad de gelatinasas en el LBA se analizó con la técnica de zimografía (Paech y Christianson, 1994) utilizando geles de poliacrilamida conteniendo gelatina, que es el sustrato de las enzimas a analizar y adaptados a un sistema Mini Protean[®] II (Bio-Rad).

Se prepararon geles de poliacrilamida 8% - gelatina 0.1% (Type A, Sigma) en presencia de SDS⁷. Se tomaron muestras de 10 μl de LBA y se mezclaron 1:1 con buffer muestra (H_2O 3.66 ml; Tris 0.5 M pH 6.8 1ml; Glicerol 0.8 ml; SDS 10%, 2.4 ml; azul de bromofenol 0.05%, 0.2 ml). Las muestras se corrieron a 150 Volts y a 4 °C

Después de la electroforesis, los geles se lavaron durante 1 hora con Triton X-100 al 2.5% (V/V) y se incubaron durante 20 horas a 37 °C con buffer de glicina 100 mM, CaCl_2 5 mM y ZnCl_2 5 mM. La reacción se interrumpió tiñendo los geles con azul Comassie (Brilliant Blue R-250, Sigma) al 0.1%, preparado con metanol absoluto y ácido acético glacial (3:1) y se destiñeron con una solución de ácido acético-metanol absoluto-agua (1:1:8).

⁷ Agua desionizada 3.64 ml; gelatina [10 mg/ml] 1.0 ml; Tris-HCl 1.5M pH 8.8, 2.5 ml; SDS (10%), 0.1ml; acrilamida/bis-acrilamida (30% / 0.8%) 2.66 ml; PA (20%), 0.05 ml y TEMED 0.01 ml.

En los geles las zonas de actividad gelatinolítica corresponden a bandas con tinción negativa y se observan como bandas claras sobre fondo azul.

Para determinar los pesos moleculares aparentes de las bandas con actividad en los geles, se utilizó una mezcla de 7 marcadores de peso molecular (Sigma) con un rango de 35 a 220 kDa. Se determinó la distancia relativa migrada por todos los marcadores estándar de peso molecular con la siguiente fórmula:

$$R_f = \text{Distancia migrada por la proteína} \div \text{distancia total migrada por el colorante}$$

Se hicieron geles por cada uno de los tiempos de exposición y geles con muestras representativas de cada uno de los grupos experimentales y control; en uno de estos geles se añadió muestra del medio condicionado de una línea celular (U2OS) que se utilizó como control positivo, ya que esta línea celular produce las gelatinasas de 72 kDa y 92 kDa. Para inhibir la actividad de las enzimas, uno de estos geles se incubó con glicina 0.1 M y EDTA 50 mM.

La actividad de gelatinasas de peso molecular aparente de 72 y 92 kDa se analizó mediante densitometría, utilizando un Gel Scan (Beckman, DU[®] Series 600) con fotoabsorbancia a 595 nm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados de todos los parámetros analizados en este trabajo se expresaron como media \pm desviación estándar. Con excepción del conteo celular y la actividad gelatinolítica, para evaluar si existen o no diferencias significativas se aplicó una prueba "t" de Student, comparando en cada uno de los parámetros evaluados el grupo experimental contra su propio grupo control utilizando un paquete estadístico SYSTAT® (Microsoft, Co.); así mismo para establecer si existen o no diferencias significativas debidas a la edad de los animales, se aplicó un análisis de varianza entre grupos experimentales y entre grupos controles.

Para el conteo celular y la actividad gelatinolítica, los resultados fueron evaluados mediante la prueba estadística de "t" de Dunnett, comparando un grupo de cobayos controles contra cada uno de los grupos experimentales.

En todos los casos se consideró la diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

La exposición a humo de cigarro (20 cigarros/día, 5 días/1, 3, 4, 6, y 8 semanas) generó animales con lesiones pulmonares progresivas de tipo inflamatorio y destructivo similares a las descritas por Selman, *et al.* (1996). La evaluación histológica mostró que estas alteraciones están representadas principalmente por un acúmulo e infiltrado de células inflamatorias de tipo mononuclear y en algunos casos de células polimorfonucleares en el espacio intersticial, de grado leve y con distribución focal en algunos de los animales expuestos durante 1 semana (Fig. 1a); leve a moderado con infiltrados intraalveolares, intersticiales y peribronquiolares hacia la 3ª y 4ª semanas (Fig. 1b). Por otra parte, a la 6ª y 8ª semanas fue de grado moderado y con distribución multifocal (Fig. 1c).

Los cambios destructivos son evidentes sólo en las muestras de animales expuestos durante 6 y 8 semanas (Fig. 1d). En éstas se observó adelgazamiento y ruptura de las paredes alveolares distales a las zonas de inflamación y presencia de clavos de retracción que son indicadoras del daño enfisematoso. En estas muestras fue notorio el agrandamiento anormal de los espacios aéreos (Fig. 1e).

Los cortes histológicos de los pulmones de cobayos utilizados como controles no mostraron evidencias de cambios inflamatorios o destructivos y en ellos se pudo apreciar la continuidad de los espacios aéreos (Fig. 1f).

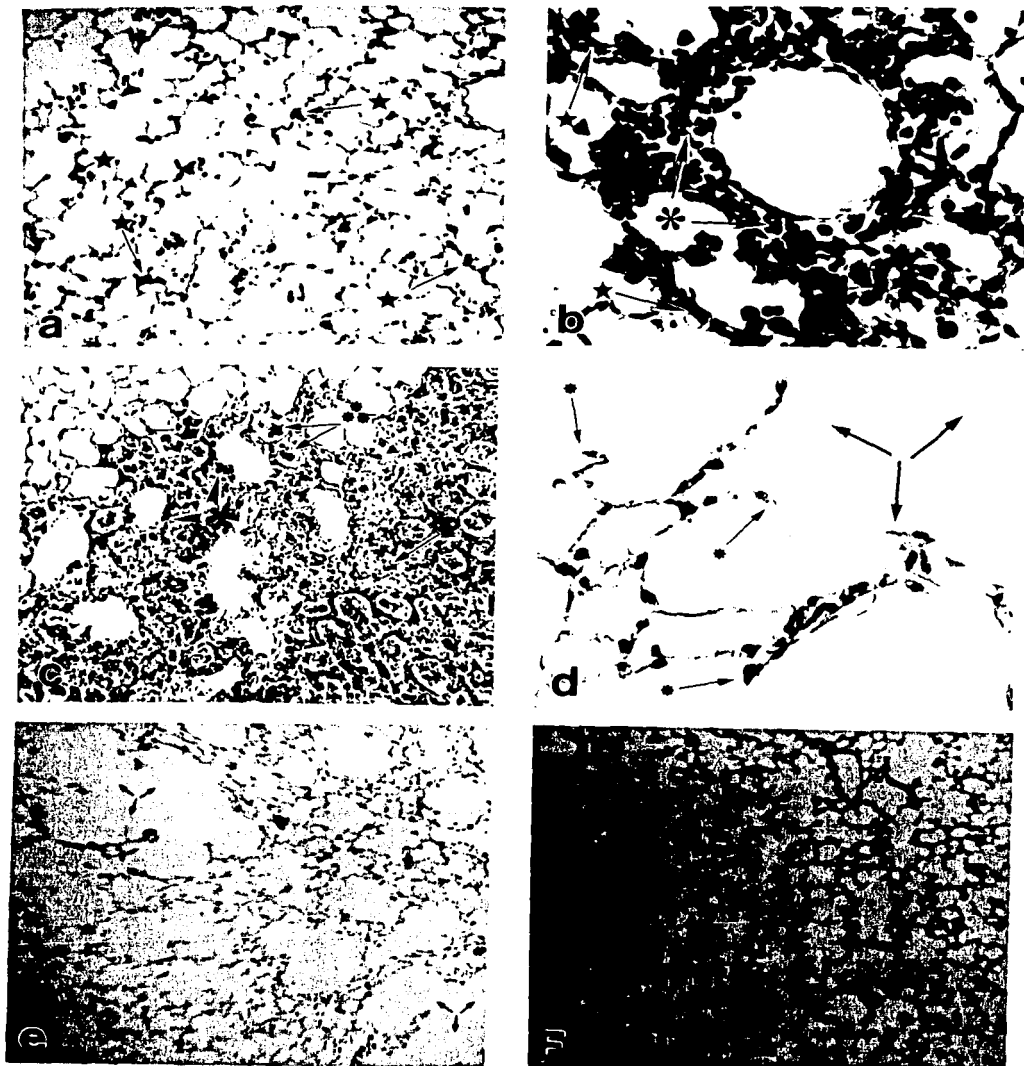


Figura 1. Micrografías de pulmón de cobayos expuestos a humo de cigarro: a) 1 semana (16x), b) 4 semanas (40x), c) 6 semanas (16x), d) 8 semanas (40x), e) 8 semanas (10x); y f) cobayo control (10x). Tinción H-E. (★) Inflamación intersticial. (✱) Inflamación peribronquiolar. (●) Inflamación intraalveolar. (●) Clava de retracción. (Y) Agrandamiento de espacios aéreos.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

Lavados broncoalveolares.

No se encontraron diferencias significativas en el volumen de fluido recuperado en los lavados broncoalveolares (LBA) de los grupos experimentales al compararlos con los controles en ninguno de los tiempos de exposición (Tabla 1); así mismo, el análisis de varianza demostró que no existen diferencias significativas en relación con la edad de los animales.

El volumen de LBA recuperado fue de 20.85 ± 0.54 ml en los grupos experimentales y 20.67 ± 0.41 ml en los grupos controles lo cual indica que tanto en los grupos experimentales como en los controles se recuperó ~87% del volumen total instilado para los lavados.

Tabla 1. *Volumen^a de fluido recuperado en LBAs^b de cobayos expuestos a humo de cigarro^{*} y cobayos no expuestos (control).*

	Experimental	Control	p
1ª Semana	21.63 ± 0.79	20.75 ± 0.93	NS
3ª Semana	21.13 ± 1.19	20.83 ± 1.12	NS
4ª Semana	20.69 ± 0.92	21.08 ± 0.80	NS
6ª Semana	20.62 ± 1.19	20.00 ± 3.51	NS
8ª Semana	20.19 ± 2.19	20.66 ± 1.51	NS

^a Todos los valores expresados en (ml).

^b Lavados broncoalveolares realizados con un volumen inicial de 24 ml.

^{*} 20 cigarros por día, 5 días por semana.

NS = Diferencia no significativa.

Conteo celular.

El número total de células recuperadas (Células $\times 10^5/\text{ml}$) en los LBAs de todos los grupos experimentales fue mayor comparado contra el grupo control, sin embargo sólo los animales expuestos durante 4, 6, y 8 semanas a humo de cigarro mostraron un incremento estadísticamente significativo (9.31 ± 1.4 para 4 semanas, 8.06 ± 1.9 para 6 semanas y 7.85 ± 1.95 para 8 semanas, contra 5.0 ± 1.07 en controles; $p \leq 0.05$. Fig. 2a).

En relación al conteo diferencial se encontró que el número de macrófagos en las muestras tuvo un ligero incremento en los animales de los grupos experimentales comparados con el grupo control, sin embargo, en ninguno de los casos el incremento fue significativo (Fig. 2b)

También se observó un aumento en el número de neutrófilos de todos los grupos experimentales, sin embargo, únicamente en los grupo de animales expuestos a humo de cigarro durante 4, 6, y 8 semanas, el incremento fue significativo (1.6 ± 0.35 para 4 semanas, 0.9 ± 0.22 para 6 semanas, y 1.09 ± 0.5 para 8 semanas contra 0.45 ± 0.19 en controles; $p \leq 0.01$ para 4 semanas y $p \leq 0.05$ para 6 y 8 semanas. Fig. 2b).

En lo que respecta a la fracción de linfocitos, en algunos grupos experimentales se observó un ligero incremento respecto al grupos control; no obstante, en ninguno de los casos la diferencia fue significativa (Fig. 2b). No se observaron cambios significativos respecto al porcentaje de eosinófilos en ninguno de los tiempos de exposición, y en todas las muestras representaron menos del 2% de la población celular (datos no mostrados).

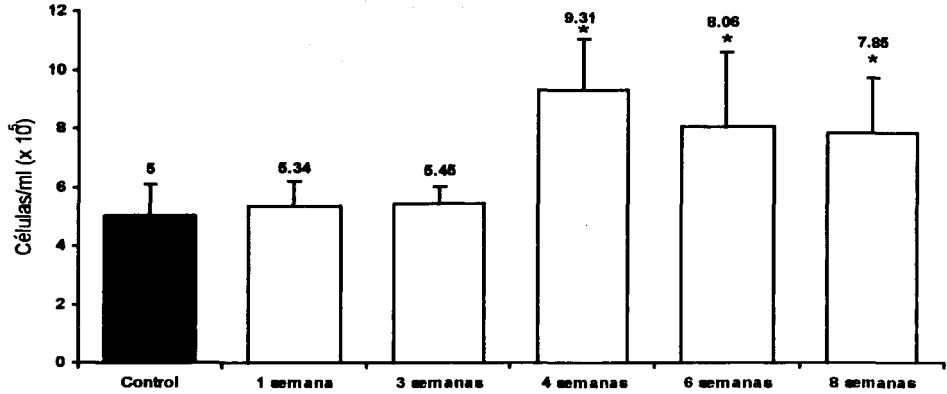


Figura 2a. Células totales recuperadas de lavados broncoalveolares de cobayos expuestos a humo de cigarro (barras claras) y cobayos control (barra oscura). En todos los casos ($n = 8$). * $p \leq 0.05$

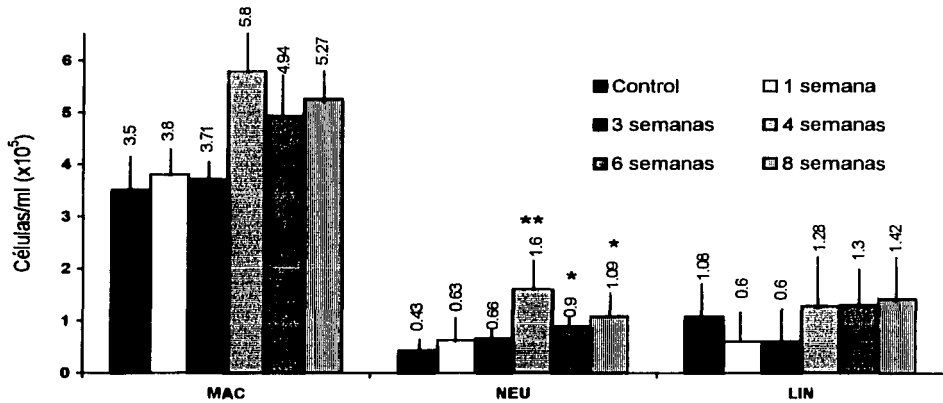


Figura 2b. Conteo diferencial de células recuperadas en LBA de cobayos control y expuestos a humo de cigarro. En todos los casos ($n = 8$). * $p \leq 0.05$
** $p \leq 0.01$. MAC= macrófagos, NEU= neutrófilos, LIN= linfocitos.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO.

Concentración de proteínas totales y colágena en el fluido de LBAs.

Los valores del contenido de proteína de los grupos experimentales no mostraron diferencias significativas al compararlos con sus respectivos grupos controles, en ninguno de los tiempos de exposición (Tabla 3).

Por otro lado, el contenido de colágena en las muestras de los grupos experimentales resultó ser más alto que el de los grupos controles (Tabla 3), sin embargo el incremento fue estadísticamente significativo sólo en los animales expuestos al humo de cigarro durante 4, 6 y 8 semanas, resultando más evidente a las 6 semanas de exposición (Figura 3).

En relación con el contenido de proteínas totales y el contenido de colágena en las muestras de fluido de los LBAs, el análisis de varianza no demostró diferencias significativas en los grupos controles ni en los grupos experimentales.

Tabla 3. *Concentración de proteína total y colágena en el fluido de LBAs de cobayos expuestos* y no expuestos a humo de cigarro.*

	PROTEÍNA (mg / ml)			COLÁGENA (µg / ml)		
	Experimental	Control	p	Experimental	Control	p
1ª Semana	0.16 ± 0.084	0.12 ± 0.060	NS	2.00 ± 1.08	1.93 ± 0.81	NS
3ª Semana	0.13 ± 0.036	0.10 ± 0.033	NS	2.44 ± 1.33	1.73 ± 0.99	NS
4ª Semana	0.13 ± 0.045	0.14 ± 0.038	NS	2.34 ± 0.54	1.43 ± 0.71	p≤0.05
6ª Semana	0.14 ± 0.049	0.16 ± 0.037	NS	3.71 ± 1.51	1.80 ± 0.28	p≤0.01
8ª Semana	0.17 ± 0.048	0.16 ± 0.026	NS	2.95 ± 0.86	1.88 ± 0.79	p≤0.05

* 20 cigarros por día, 5 días por semana.

NS = Diferencia no significativa.

Actividad elastolítica.

La actividad elastolítica (medida como la cantidad de elastina degradada) fue detectada en las muestras de los fluidos de los LBAs de todos los grupos experimentales y controles. Los valores de degradación de elastina mostraron una tendencia que refleja un aparente incremento en la degradación de elastina conforme aumenta el tiempo de exposición al humo de cigarro, no obstante sólo el grupo de animales expuestos durante 8 semanas al humo de cigarro resultó ser estadísticamente diferente comparado contra su grupo control (Tabla 4); estos resultados se muestran de manera gráfica en la figura 4.

Por otra parte, el análisis de varianza mostró que el incremento secuencial de la actividad elastolítica entre los grupos experimentales fue significativo, únicamente entre el grupo experimental de 8 semanas comparado contra el grupo experimenta de 1 semana. aún cuando entre grupos controles también se presentó un aumento secuencial en los valores de degradación de elastina, este no fue estadísticamente significativo.

Tabla 4. *Actividad elastolítica (μg de elastina degradada / ml) en el fluido de los LBAs de cobayos expuestos* y no expuestos a humo de cigarro.*

	1ª Semana	3ª Semana	4ª Semana	6ª Semana	8ª Semana
Experimental	7.82 \pm 2.99	9.06 \pm 3.38	8.64 \pm 2.97	11.48 \pm 3.73	12.65 \pm 2.25
Control	7.89 \pm 2.97	7.25 \pm 2.77	8.92 \pm 1.37	9.48 \pm 1.65	9.06 \pm 1.51
	NS	NS	NS	NS	p \leq 0.05

* 20 cigarros por día, 5 días por semana.

NS = Diferencia no significativa.

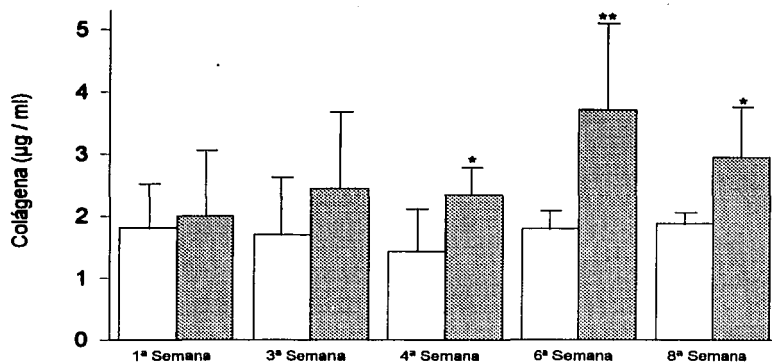


Figura 3. Contenido de colágena en el fluido del LBA de cobayos control (barras claras; n=6) y expuestos a 20 cigarros por día/5 días por semana (barras oscuras; n=8). *p<0.05, **p<0.01

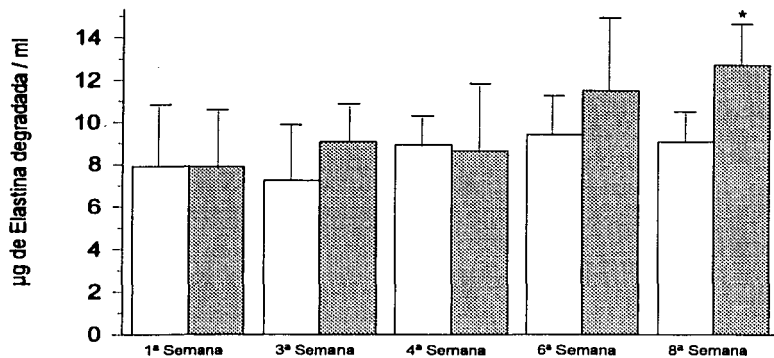


Figura 4. Actividad elastolítica en el fluido del LBA de cobayos control (barras claras; n=6) y expuestos a 20 cigarros por día/5 días por semana (barras oscuras; n=8). *p<0.05

Actividad gelatinolítica en fluidos de LBAs (Zimogramas).

El análisis por zimografía reveló la presencia de actividad de gelatinasas en los fluidos de los LBAs de cobayos expuestos a humo de cigarro y controles. En todas las muestras que se corrieron en los geles, fue evidente la presencia de varias bandas con actividad en contra del substrato (gelatina), sin embargo la actividad estuvo más marcada en una banda cuya *Mr* fue de ~66 kDa y en otra de ~95 kDa (Fig. 5).

La distribución de los valores de absorbancia que se registraron para las bandas correspondientes a *Mr* ~66 kDa mostraron un aparente incremento secuencial en la intensidad de las bandas de los animales expuestos a humo de cigarro con respecto a los controles (Fig. 8), sin embargo el análisis estadístico no demostró una diferencia significativa para ninguno de los grupos experimentales. Respecto a la banda con *Mr* ~95 kDa el análisis densitométrico evidenció un incremento progresivo en la intensidad de las bandas de los grupos experimentales comparados con los controles; este incremento alcanzó significancia estadística en los grupos experimentales de 6 y 8 semanas (Fig. 9). Ver también figura 6.

En todas las muestras se evidenciaron bandas con actividad a una *Mr* superior a los 200 kDa y en algunas muestras también fueron evidentes bandas con actividad a una *Mr* de ~40 kDa (ver Fig. 6). La incubación con EDTA 50 mM logró la inactivación total de las bandas con actividad gelatinolítica sobre los geles (Fig. 7).

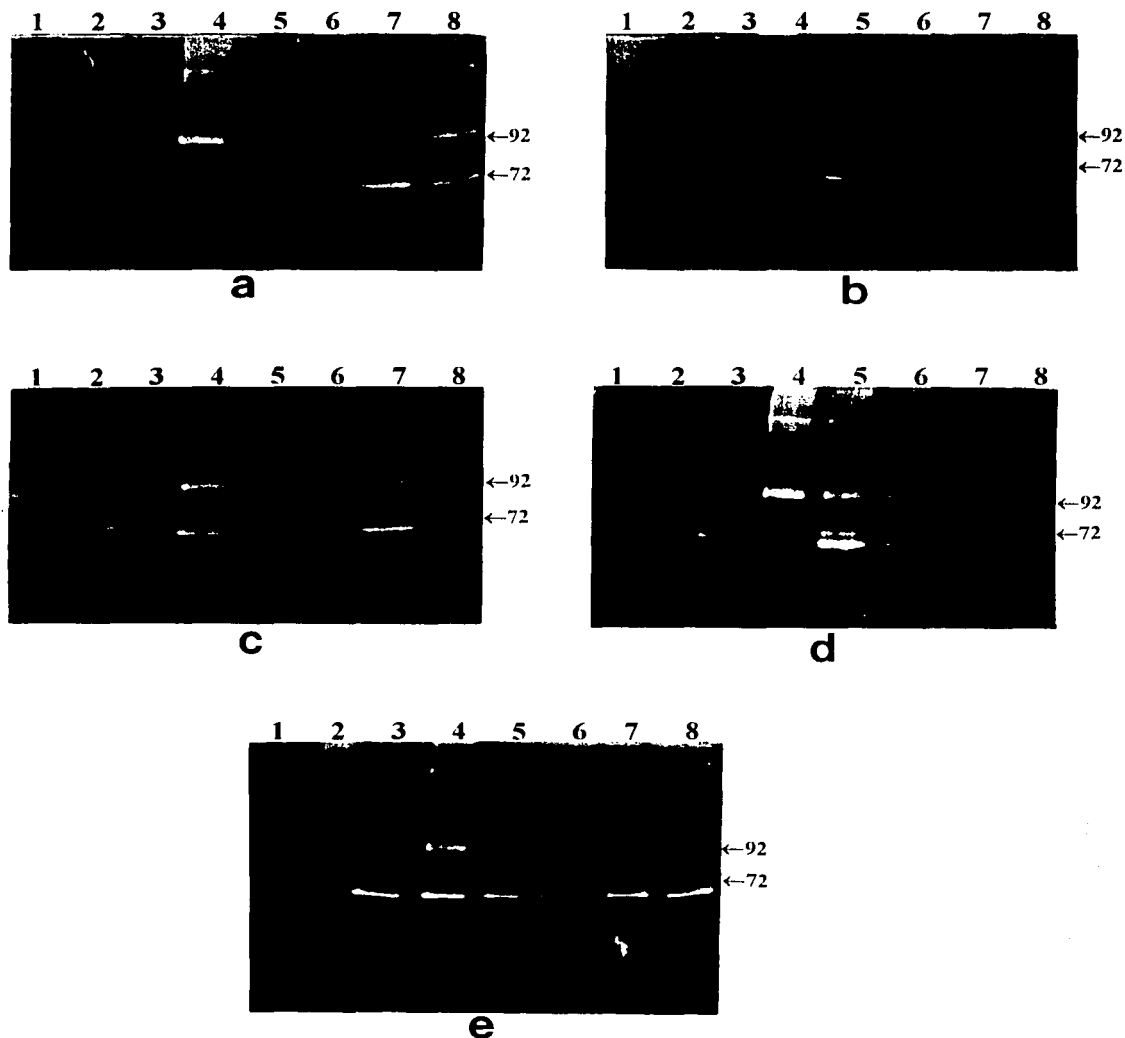


Figura 5. Zimogramas de gelatina de LBAs de cobayos expuestos a humo de cigarro a) 1 semana, b) 3 semanas, c) 4 semanas, d) 6 semanas y e) 8 semanas. En todos los casos: carril 1 (marcadores de peso molecular), carril 2 (vacío), carril 3 (cobayo control), carriles 4-8 (cobayos experimentales). Se marcan las zonas de degradación para la gelatinasa A de 72 kDa y la gelatinasa B de 92 kDa.

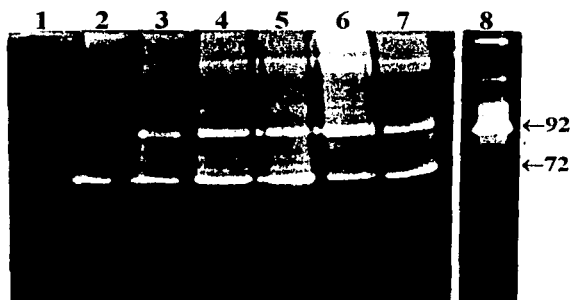


Figura 6. Zimograma de gelatina de LBAs de cobayos expuestos a humo de cigarro: carril 3 (1 semana), carril 4 (3 semanas), carril 5 (4 semanas), carril 6 (6 semanas), carril 7 (8 semanas). Carril 1 (marcadores de peso molecular). Carril 2 (cobayo control). Carril 8 (muestra de medio condicionado de la línea celular U2OS). Se marcan las zonas de degradación para la gelatinasa A de 72 kDa y la gelatinasa B de 92 kDa.

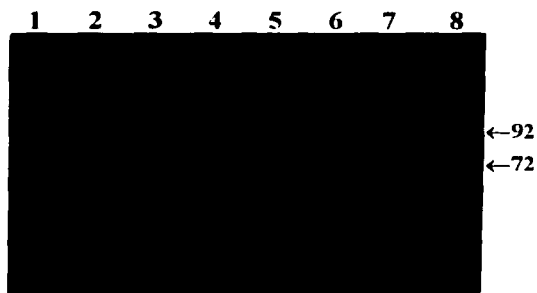


Figura 7. Zimograma (figura 6) incubado con EDTA 50 mM.

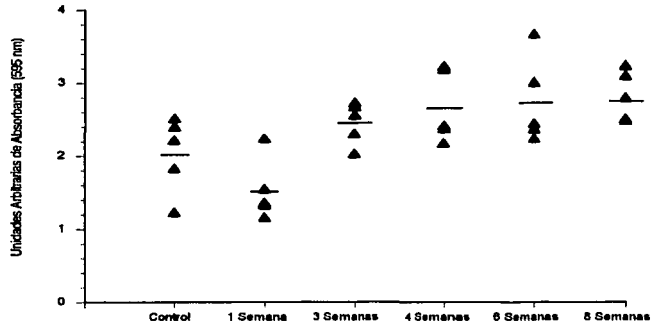


Figura 8 . Distribución de los valores de absorbancia registrados para la gelatinasa A (*Mr* 66 kDa). Las líneas horizontales representan la media de 5 datos.

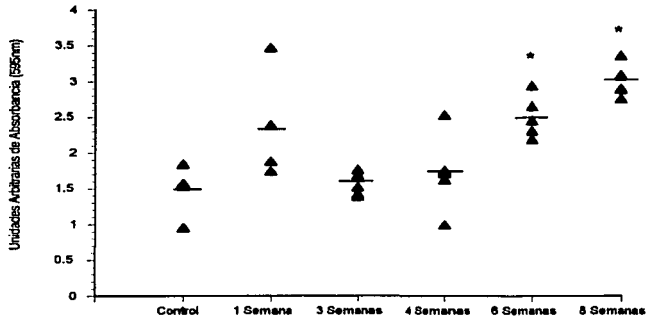


Figura 9 . Distribución de los valores de absorbancia registrados para la gelatinasa B (*Mr* 95kDa). Las líneas horizontales representan la media de 5 datos. * $p < 0.05$

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

La degradación de las fibras elásticas ha constituido por más de 30 años el proceso central en la teoría del desequilibrio Proteasas-Antiproteasas que intenta explicar la patogénesis del enfisema y por ende, las enzimas con actividad elastolítica, sobre todo la elastasa de neutrófilos, y su principal inhibidor, la α_1 -AT constituyen las principales moléculas involucradas en este contexto. (Janoff, 1985; Gadek y Pacht, 1990; Snider, *et al.* 1991; Evans y Pryor, 1994).

Recientes estudios realizados por D'Armiento *et al.* (1992) y por Selman *et al.* (1996) sugieren fuertemente que la colagenasa intersticial, y el proceso colagenolítico, pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo del enfisema. En este sentido, el presente trabajo se diseñó con el objeto de evaluar la presencia de colágena soluble, así como la participación de enzimas elastolíticas y gelatinolíticas en LBAs de animales, que se sabe, desarrollan alteraciones enfisematosas como respuesta a la inhalación de humo de cigarro.

Aún cuando el análisis morfológico no se consideró dentro de los objetivos de este estudio, los pulmones de todos los cobayos experimentales y controles se evaluaron histológicamente para mostrar que éstos responden al humo de cigarro, como previamente se ha mostrado (Selman, *et al.* 1996). Referente a este punto, los resultados obtenidos demostraron que en los animales expuestos a humo de cigarro ocurre un proceso inflamatorio (ver Fig. 1a-e), que progresa con el tiempo de exposición hasta que se generan lesiones compatibles con las definidas para el enfisema en los animales expuestos durante 8 semanas al humo de cigarro. Estas lesiones se evidenciaron por la ruptura de

paredes alveolares, con presencia de clavos de retracción (Fig. 1d) y por la generación de agrandamientos anormales en los espacios aéreos (Fig. 1e).

La ocurrencia de las lesiones inflamatorias y destructivas en los animales de los diversos grupos experimentales fue heterogénea. Este hecho puede deberse a una respuesta diferencial en los animales, que al igual que en los humanos, obedece a las variaciones de susceptibilidad que como individuo presenta cada animal, no obstante, las lesiones mencionadas reflejan el comportamiento general de los animales en este modelo.

El uso del LBA para el estudio de procesos inflamatorios en modelos animales ha sido muy extenso y provee una fuente para el análisis de la respuesta celular y bioquímica en infinidad de padecimientos que involucran un daño proteolítico a la matriz extracelular (para revisión ver Henderson, 1988). La técnica del LBA para animales de laboratorio ha sido ampliamente revisada (Henderson, *et al.* 1987; Henderson y Muggenburg, 1992), y se ha propuesto que para animales pequeños de laboratorio, como los cobayos, de deben utilizar instilados con un volumen que no sea mayor del 80% del volumen total del pulmón insuflado a una presión de 20 mm. H₂O. De acuerdo con esto, los lavados utilizados en este trabajo (con 8 ml de SSF) son apropiados para obtener resultados más o menos confiables. Por otro lado, se decidió realizar 3 lavados consecutivos; de acuerdo con Henderson (1988), el número de alícuotas puede variar, y si se asume que el volumen de pulmón que puede ser lavado es igual al volumen de fluido instilado por cada lavado, las comparaciones entre los constituyentes celulares y bioquímicos del fluido recuperado pueden ser válidos si se expresan como la cantidad total por ml de lavado; en este trabajo los resultados fueron expresados tomando en cuenta estas consideraciones.

La obtención de los LBAs de los animales experimentales y controles fue muy constante (ver Tabla 1) y el porcentaje de volumen recuperado (~87%) es considerado

como muy bueno ya que de acuerdo con Henderson y Muggenburg (1992) el promedio de volumen que uno debe recuperar es del 75% y entre más alto sea este valor, los resultados derivados de su análisis pueden ser considerados como más aceptables.

La celularidad es un parámetro que no deber pasar desapercibido en ningún tipo de estudio realizado en LBA debido a que, en gran medida, puede reflejar una condición normal o patológica. En este estudio el valor promedio del número total de células recuperadas en los LBAs del grupo de cobayos utilizados como controles son más bajos que los valores reportados para cobayos normales, que es del orden de 7×10^5 (Henderson, 1988); a pesar de este hecho, la dispersión de los datos en el grupo control no fue muy grande y los valores semejan a los reportados por Selman, *et al.* (1996), además hay que considerar que los valores reportados como normales son para cobayos de mayor edad y de otras características. En adición a lo anterior, en este ensayo los LBAs para los animales controles y los experimentales fueron muy parecidos, por lo cual las comparaciones entre estos son válidas. De esta comparación resultó que los grupos experimentales mostraron una tendencia de incremento en el número total de células recuperadas, que fue significativo en los animales expuestos a humo de cigarro durante 4, 6, y 8 semanas (ver Fig. 2a). Como era de esperarse, la población celular más abundante en los LBAs fueron los macrófagos y aún cuando no se observó un incremento significativo en ninguno de los grupos experimentales respecto al grupo control, la tendencia hacia un aumento es evidente (ver Fig. 2b). Los neutrófilos mostraron un comportamiento similar, pero en este caso, la diferencia de los grupos de 4, 6, y 8 semanas obtuvieron significancia estadística. Por su parte, las fracciones de linfocitos y de eosinófilos permanecieron sin cambios. El incremento en el número total de células, sobre todo de macrófagos y neutrófilos puede corresponder con los sucesos que ocurren en la respuesta celular hacia un proceso inflamatorio (Janoff, *et al.* 1987). Un comportamiento celular similar se ha reportado en sujetos fumadores respecto a no fumadores (Janoff, *et*

al. 1983), y esto podría sugerir que los resultados de este ensayo, indican que el incremento en la proteólisis puede resultar por un aumento en el número de células, como respuesta celular producida por la inhalación del humo de cigarro.

La concentración de proteínas ha sido utilizado como un parámetro bioquímico que puede sugerir la ocurrencia de un daño a la barrera alveolo-capilar en un proceso inflamatorio (Henderson, 1988); en este ensayo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales y controles (ver Tabla 2). La variación intergrupar en este sentido no permitió definir una tendencia que pudiera establecer el comportamiento en ninguno de los casos. Los valores encontrados se encuentran dentro del rango de los valores reportados para cobayos controles que es de aproximadamente 0.13 mg/ml (Henderson, 1988). De acuerdo con esto, los resultados de este trabajo parecen ser valores normales, en algunos casos ligeramente más altos (ver Tabla 2) y la única explicación factible, si es que descartamos el error sistemático en la medición, es el hecho de que durante la exposición semanal al humo de cigarro los animales descansaban sábados y domingos y el sacrificio se llevó a cabo al inicio de la semana y quizás este descanso modificó los niveles de proteína, de manera que no se pudo observar un aumento evidente como era de esperarse. Se sabe que en la exposición a agentes oxidantes como a NO, el incremento de proteína en el LBA es indicativo de un daño inflamatorio; sin embargo, el aumento es evidente si el estímulo permanece constante (revisado en Henderson, 1988). En un estudio bioquímico en LBA de sujetos fumadores Fera, *et al.* (1986) encontraron que la respuesta del daño proteolítico es más fuerte inmediatamente después del estímulo a humo de cigarro; estos hechos podrían respaldar la sugerencia mencionada.

Considerando todo lo anterior, en el análisis del contenido de colágena y de la actividad elastolítica y gelatinolítica, los valores registrados se normalizaron por volumen

de LBA ya que de esta manera los cambios registrados pueden reflejar de manera más confiable los procesos proteolíticos ocurridos en el parénquima pulmonar.

Tomando en cuenta que las colágenas, al igual que otras moléculas, se encuentran sujetas a un constante recambio que es gobernado por un proceso homeostático entre la síntesis y la degradación, el incremento significativo en los niveles de hidroxiprolina encontrados en los LBAs de los animales expuestos a humo de cigarro 4, 6, y 8 semanas (ver Fig. 3) puede ser una evidencia del proceso colagenolítico producido por la acción de enzimas proteolíticas que despolimerizan y degradan moléculas de colágena en la matriz extracelular. Niveles elevados de hidroxiprolina también se han encontrado en los LBAs de animales con procesos de fibrosis pulmonar (Henderson, 1988), y en pacientes con ARDS⁸, la degradación de colágena de membranas basales pudo ser evidenciada a través de la cuantificación de fragmentos de colágena en el LBA (Kondoh, *et al.* 1992). A este punto cabe hacer algunos cuestionamientos: 1) ¿Los niveles de hidroxiprolina en los LBAs reflejan únicamente la degradación de colágena en el pulmón?, y si es así, 2) ¿Estos hallazgos pueden ser indicativos de un cambio en el contenido de colágena en los pulmones de los cobayos expuestos a humo de cigarro?. Efectivamente, el incremento de hidroxiprolina en los LBAs puede reflejar una mayor degradación de moléculas de colágena en el pulmón, no obstante, también puede ser que esta hidroxiprolina provenga de la colágena que es recién sintetizada y depositada en el espacio extracelular. Existen varios estudios que han fallado en demostrar cual es el cambio verdadero en el contenido de colágena y elastina en pulmones enfisematosos; sin embargo, en lo que respecta a la colágena, se ha propuesto que su contenido puede variar de valores normales a incrementados dependiendo del tipo de enfisema (Cardoso, *et al.* 1993; Lang, *et al.* 1993, 1994). Estos estudios sugieren fuertemente la existencia de un proceso dinámico de degradación-reparación que en sujetos fumadores puede originar un depósito de

⁸ Síndrome de Estrés Respiratorio en Adultos.

colágena. En un modelo similar al utilizado en este trabajo, Wright y Churg (1995) reportaron que en cobayos expuestos durante 6 y 12 meses a humo de cigarro, ocurre un depósito de colágena que es indicativo de este proceso, Finlay, *et al.* (1996) reportaron hallazgos similares en un modelo de enfisema inducido por elastasa, en ratas.

Cabe señalar que los resultados de este estudio no son indicativos de la concentración real de colágena soluble que puede existir *in vivo* en los pulmones de los cobayos, y mucho menos del contenido de colágena pulmonar debido a que la hidroxiprolina que uno puede medir en los LBAs representa menos del 50% de la totalidad de hidroxiprolina soluble, y a su vez, ésta representa menos del 0.5% de la colágena total en el pulmón (Henderson, 1988). De acuerdo con Selman, *et al.* (1996) la degradación de colágena representa un proceso clave en la génesis del enfisema y es mediado, en gran parte, por la acción de la colagenasa intersticial; los resultados de este trabajo correlacionan fuertemente con los resultados de actividad colagenolítica en el parénquima encontrados por estos investigadores, lo cual sugiere que el incremento en los niveles de colágena en los LBAs de animales expuestos a humo de cigarro podría ser el reflejo del fenómeno de degradación de colágena ocurrido en el parénquima pulmonar, claro está, sin olvidar que este proceso pudiera involucrar el fenómeno de degradación-reparación mencionado con anterioridad.

Respecto a la actividad elastolítica, este proceso se evidenció en los LBAs de todos los animales experimentales y controles. Como puede observarse, la figura 4 muestra que existe una tendencia hacia el incremento en la actividad elastolítica; este incremento obtuvo significancia estadística en el grupo experimental de 8 semanas al compararlo contra su grupo control. Es evidente que intergrupalmente se observó un aumento aparente en la actividad elastolítica, sin embargo el análisis de varianza demostró que para los grupos controles no fue significativo, no así para los grupos experimentales en donde

este incremento fue representativo entre el grupo experimental de 1 semana y el de 8 semanas. El proceso elastolítico es un parámetro indicativo de la presencia y actividad de enzimas que tienen la capacidad de degradar elastina, y si se sabe que la respuesta enzimática está ligada con el incremento en el número de células que pueden liberar enzimas elastolíticas, se puede suponer que los niveles de actividad de elastasas pueden ser más altos en animales expuestos a humo de cigarro respecto a los controles. En estudios acerca de los niveles de actividad de elastasas, Janoff, *et al.* (1983) y Fera, *et al.* (1986) demostraron que dicha actividad se encuentra más incrementada en los LBAs de sujetos fumadores comparados con sujetos no fumadores, siendo que esta actividad pudiera deberse a la elastasa de neutrófilos, y en parte a una metaloproteinasas derivada de macrófagos. En ambos casos, el papel putativo de la elastasa de neutrófilos cobró mayor peso debido a que los sustratos utilizados fueron diseñados sintéticamente con alta especificidad por elastasas derivadas de neutrófilos. Utilizando elastina insoluble como sustrato, Senior, *et al.* (1989) demostró que una buena parte de la actividad elastolítica puede ser atribuida a los macrófagos. En un estudio reciente Becerril (1995) encontró que la actividad elastolítica de los macrófagos derivados de pulmones de cobayos expuestos a humo de cigarro durante 6 semanas, fue mayor comparada con la actividad de macrófagos derivados de cobayos no expuestos a humo de cigarro; en ambos casos la actividad elastolítica se atribuyó a la metaloelastasa derivada de los macrófagos; sin embargo, parece ser que una condición para que ocurra la degradación de elastina, es que los macrófagos estén en contacto directo con el sustrato (Shapiro, *et al.* 1991). Los resultados obtenidos en este trabajo, no esclarecen cuales son las enzimas responsables del incremento de actividad evidenciado en los animales experimentales, sobre todo en el grupo de cobayos expuestos durante 8 semanas al humo de cigarro, pero si correlacionan con el aumento de células (principalmente macrófagos y neutrófilos) que producen enzimas con actividad elastolítica, lo cual sugiere que el humo de cigarro induce un incremento en la producción y actividad de enzimas elastolíticas.

El último de los parámetros bioquímicos que se decidió analizar como indicador de una respuesta proteolítica fue la actividad de gelatinasas. De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis por zimografía, las bandas más evidentes con actividad gelatinolítica sobre los geles fueron aquellas que podrían corresponder a la gelatinasa A y la gelatinasa B (ver Fig. 5 y 6). El incremento de intensidad de las bandas es una manera indirecta de asumir el supuesto de que existe una mayor presencia y/o actividad de estas enzimas. Los resultados mostraron un aumento secuencial en la intensidad de la banda con $M_r \sim 66$ kDa en los cobayos expuestos a humo de cigarro comparados contra el grupo de cobayos utilizados como controles pero no mostraron evidencias de que el aumento fuera significativo (ver Fig. 8). El mismo comportamiento se observó para la banda con $M_r \sim 95$ kDa que corresponde a la gelatinasa B, sin embargo la diferencia entre el grupo control y los grupos de animales expuestos a 6 y 8 semanas fue significativa (ver Fig. 9). La presencia de estas gelatinasas también se ha reportado en LBA de sujetos con bronquiectasia (Sepper, *et al.* 1994). El incremento de actividad en ambas gelatinasas, la MMP-2 y la MMP-9, sugiere un papel clave en el proceso de degradación de la matriz extracelular, sobre todo de colágena tipo IV y colágena desnaturalizada (Sepper, *et al.* 1994; Delacourt, *et al.* 1995), aunque también su acción se asocia con la degradación de otros componentes como la elastina (Senior, *et al.* 1991), no obstante, la expresión de la gelatinasa B parece ser un mejor indicador de una respuesta proteolítica relacionada con un proceso inflamatorio ya que es común que sea liberada por macrófagos y neutrófilos bajo condiciones patológicas (Sibille y Reynolds, 1990). La presencia y comportamiento de las dos formas de gelatinasas analizadas en este trabajo (de 66 kDa y 95 kDa) pueden ser explicadas en términos del incremento del número de macrófagos y neutrófilos recuperados, sobre todo, en los últimos tiempos de exposición al humo de cigarro (ver Fig. 2b y 6) siendo que la gelatinasa de 66 kDa es indicativa de la forma activa de la enzima, mientras que la gelatinasa de 95 kDa representa a la forma de proenzima inactivada (Tschesche, *et al.* 1992). Cabe señalar que en este ensayo, también se demostró

la presencia de una forma de gelatinasa de alto peso molecular (> 200 kDa) en todas las muestras. Se ha reportado que formas con M_r mayores de 200 kDa son secretadas *in vitro* por células embrionarias y transformadas de ratas (Bernhard, *et al.* 1990) y por células epiteliales bronquiales de humano (Mei, *et al.* 1996). El significado biológico de esta forma de gelatinasa se desconoce pero dado que toda la actividad en los geles fue inhibida por EDTA (ver Fig. 7), esto indica su naturaleza de metaloenzima, por lo cual se puede sugerir que corresponde a oligomeraciones de las formas de gelatinasas A y B.

En conclusión, independientemente de que el término “actividad proteolítica” involucra un fenómeno general, que describe una gran variedad de procesos en los cuales participan conjuntamente infinidad de enzimas con actividad en contra de los diversos componentes de la matriz extracelular (Werb y Alexander, 1993), los resultados bioquímicos derivados de este trabajo están estrechamente ligados con los hallazgos que evidencian la generación de un proceso enfisematoso inducido por humo de cigarro en cobayos, y que sugieren que la expresión de la colagenasa intersticial y la actividad colagenolítica, juegan un papel clave en el desarrollo de la enfermedad (Selman, *et al.* 1996). En este sentido, se puede sugerir que en este modelo no se puede descartar la participación de otros procesos, como la colagenólisis, siendo que esto pone en tela de juicio la participación única de un proceso elastolítico manejado en la teoría del desequilibrio Proteasas-Antiproteasas.

Si consideramos que la respuesta bioquímica y celular, evidenciadas a través de los parámetros evaluados en esta tesis, corresponden con los fenómenos esperados para un proceso inflamatorio inducido por humo de cigarro, entonces se puede sugerir que los fenómenos de degradación que ocurren en el parénquima pulmonar, pueden ser evidenciados a través del estudio de los LBAs y que sin lugar a duda, los animales de este modelo representan un medio confiable para el estudio de la génesis del enfisema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Becerril, L.C.B. 1995. *Evaluación de la capacidad elastolítica de macrófagos alveolares y macrófagos del intersticio pulmonar en cobayos expuestos a humo de cigarro*. Tesis Profesional, Fac. de Ciencias, UNAM. México, D.F. 78 pp.
2. Bernhard, E.J., R.J. Muschel, and E.D. Huges. 1990. Mr 92,000 gelatinases release correlates with the metastatic phenotype in the transformed rat embryo cells. *Cancer Res.* **50**: 3872-3877.
3. Bienkowski, S.R. 1991. Interstitial collagens. En: Crystal, R.G., J.B. West, *et al.* (eds). *The Lung: Scientific Foundations*. Raven Press, Ltd., New York. p. 381-388.
4. Birkedal-Hansen, H. 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 728-725.
5. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
6. Brown, J.C. and R. Timpl. 1995. The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**: 484-490.
7. Burgeson, R.E. 1988. New collagens, new concepts. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **4**: 551-577.
8. Cantor, J.O., and G.M. Turino. 1991. Animal models of emphysema. En: Cherniack, N.S. (de). *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. W.B. Saunder Company. USA. p. 63-69.
9. Campbell, E.J., R.M. Senior, and H.G. Welgus. 1987. Extracellular matrix injury during lung inflammation. *Chest.* **92**: 161-167.
10. Cardoso, W.V., H.S. Sekhon, D.M. Hyde, and W.M. Thurlbeck. 1993. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 975-981.
11. D'Armiento, J., S.S. Dalal, Y. Okada, R.A. Berg, and K. Chada. 1992. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell*, **71**: 955-961.

12. Delacourt, C., M. D'Ortho, Y. Macquin-Mavier, S. Pezet, A. Harf, and C. Lafuma. 1995. Increased 92 kD gelatinase activity from alveolar macrophages in newborn rats. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **151**: 1939-1945.
13. Dunsmore, S.E. and D.E. Rannels. 1996. Extracellular matrix biology in the lung. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)* **270**: L3 - L27.
14. Evans, M.D., and W.A. Pryor. 1994. Cigarette smoking, emphysema and damage to α 1-proteinase inhibitor. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)*. **266**: L593-L611.
15. Fera, T., R.T. Abboud, A. Richter, and S.S. Johal. 1986. Acute effect of smoking on elastase-like esterase activity and immunologic neutrophil elastase levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* **133**: 568-573.
16. Finlay, G.A., M.D. O'Donnell, C.M. O'Connor, J.P. Hayes, and M.X. FitzGerald. 1996. Elastin and collagen remodeling in emphysema. *Am. J. Pathol.* **149**: 1405-1415.
17. Gadek, J.E., and E.R. Pacht. 1990. The protease-Antiprotease balance within the human lung: Implications for the Pathogenesis of emphysema. *Lung*. **168** (Suppl): 552-564.
18. Henderson, R.F., J.L. Mauderly, J.A. Pickrell, F.F. Hahn, H. Muhle, and H. Rebar. 1987. Comparative study of bronchoalveolar lavage fluid: Effect of species, age, and method of lavage. *Exp. Lung Res.* **13**: 329-342.
19. Henderson, R.F. 1988. Use of bronchoalveolar lavage to detect lung damage. En: Gardner, D.E., J.D. Crapo., E.J. Massaro. (eds). *Toxicology of the lung*. Raven Press, New York. p. 239-268.
20. Henderson, R.F. and B.A. Muggenburg. 1992. Bronchoalveolar lavage in animals. En: Baughman, R.P. (ed). *Bronchoalveolar lavage*. Mosby Year Book, Inc., St. Louis MO. p. 265-287.
21. Higgins, M. 1991 Risk factors associated with Chronic Obstructive Lung Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **624**: 7-17.
22. Hubbard, R.C., M.L. Brantly, and R.G. Crystal. 1991. Proteases. En: Crystal, R.G., J.B. West, et al. (eds). *The Lung: Scientific Foundations*. Raven Press, Ltd., New York. p. 3-13.

23. Janoff, A., L. Raju, and R. Dearing. 1983. Levels of elastase activity in bronchoalveolar lavage fluid of healthy smokers and nonsmokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* **127**: 540-544.
24. Janoff, A. 1985. Elastases and emphysema: Current Assessment of the Protease-Antiprotease Hypothesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**: 417-433.
25. Janoff, A., W.A. Pryor, and Z.H. Bengali. 1987. Effects of tobacco smoke on cellular and biochemical processes in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**: 1058-1064.
26. Kivirikko, K.I., and R. Myllyä. 1989. Biosynthesis of collagens. En: Piez, K.A. and A.H. Reddi (eds). *Extracellular Matrix Biochemistry*. Elsevier, New York. p. 83-118.
27. Kondoh, Y., H. Taniguchi, F. Taki, K. Takagi, and T. Satake. 1992. 7S collagen in bronchoalveolar lavage fluid of patients with Adult Respiratory Distress Syndrome. *Chest.* **101**: 1091-1094.
28. Kühn, K. 1994. Basement membrane (Type IV) collagen. *Matrix Biol.* **14**: 439-445.
29. Lamb, D. 1995. Pathology. En: Calverley, P., and N. Pride. (eds). *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Chapman & Hall Medical. London. p. 9-34.
30. Lang, M.R., G.W. Fiaux, D.J.S. Hulmes, D. Lamb, and A. Miller. 1993. Quantitative studies of human lung airspace wall in relation to collagen and elastin content. *Matrix.* **13**: 471-480.
31. Lang, M.R., G.W. Fiaux, M. Gillooly, J.A. Stewart, D.J.S. Hulmes, and D. Lamb. 1994. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax.* **49**: 319-326.
32. Linsenmayer, T.F. 1991. Collagen. En: Hay, E.D. (ed). *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Press, New York. p. 7-45.
33. Luisetti, M., F. Meloni, P. Ballabio, and G. Leo. 1993. Role of bronchial and bronchoalveolar lavage in chronic obstructive lung disease. *Monat. Arch. Chest Dis.* **48** (1): 54-7.
34. Matrisian, L.M. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays.* **14** (7): 455-463.

35. Matrisian, L.M. 1994. Matrix metalloproteinase gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **732**: 42-50.
36. Mecham, R.P., and J.E. Heuser. 1991. The elastic fiber. En: Hay, E.D. (ed). *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Press, New York. p. 79-109.
37. Mecham, R.P. 1991. Elastin synthesis and fiber assembly. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **624**: 137-146.
38. Mecham, R.P., I.W. Prosser, and Y. Fukuda. 1991. Elastic fibers. En: Crystal, R.G., J.B. West, *et al.* (eds). *The Lung: Scientific Foundations*. Raven Press, Ltd., New York. p. 389-398.
39. Mei, P.Y., J.M. Buhler, M.P. d'Ortho, F. Lebargy, C. Delclaux, A. Harf, and C. Lafuma. 1996. Expression of matrix metalloproteinases gelatinases A and B by cultured epithelial cells from human bronchial explants. *J. Biol. Chem.* **271**: 15580-15589.
40. Murphy, G., and A.J. Docherty. 1992. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **7**: 120-125.
41. Olsen, B.R. 1991. Collagen biosynthesis. En: Hay, E.D. (ed). *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Press, New York. p. 177-217.
42. Paech, C., and T. Christianson. 1994. Zimography of proteases. En: Celis, J.E. (ed). *Cell Biology: A laboratory handbook*. Vol. 3. Academic Press, INC. USA. p. 264-271.
43. Parks, W.C., and S.B. Deak. 1990. Tropoelastin heterogeneity: implications for protein function and disease. *Am. J. Resp. Cell. Moll. Biol.* **2**: 399-406.
44. Prockop, D.J., K.I. Kivirikko, L. Tuderman, and N.A. Guzman. 1979. The biosynthesis of collagen and its disorders (part 1). *N. Engl. J. Med.* **301**: 13-21.
45. Prockop, J.D., and K.I. Kivirikko. 1995. Collagens: Molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 403-434.
46. Pryor, W.A. 1992. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Rad. Biol. Med.* **13**: 659-676.
47. Ramos, C., R. Sansores, C. Becerril, y M. Montaña. 1996. Las fibras elásticas y el pulmón. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx.* **9**: 53-66.

48. Rojkind, M., and E. González. 1974. An improved method for determining specific radioactivities of proline-14C and hydroxyproline-14C in collagen and in noncollagenous proteins. *Annal. Biochem.* **57**: 1-7.
49. Rosenbloom, J., M. Bashir, H. Yeh, J. Rosenbloom, N. Ornstein-Goldstein, M. Fazio, K. Veli-Matti, and J. Uitto. 1991. Regulation of elastin gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **624**: 116-136.
50. Rubio, H., y M. Fabian. 1995. El tabaquismo y su repercusión a nivel de la salud. En: *Información básica sobre el tabaquismo*. SSA, México. p. 5-17.
51. Selman, M., M. Montaña, C. Ramos, B. Vanda, C. Becerril, J. Delgado, R. Sansores, R. Barrios, and A. Pardo. 1996. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Moll. Physiol.)* **271**: L734 - L743.
52. Senior, R.M., N.L. Connolly, J.D. Cury, H.G. Welgus, and E.J. Campbell. 1989. Elastin degradation by human alveolar macrophages: A prominent role of metalloproteinase activity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**: 1251-1256.
53. Senior, R.M., G.L. Griffin, C.J. Fliszar, S.D. Shapiro, G.I. Goldberg, and H.G. Welgus. 1991. Human 92-and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J. Biol. Chem.* **266**: 7870-7875.
54. Sepper, R., Y.T. Kontinen, T. Sorsa, and H. Koski. 1994. Gelatinolytic and type IV collagenolytic activity in bronchiectasis. *Chest.* **106**: 1129-1133.
55. Shapiro, S.D., H.G. Campbell, and R.M. Senior. 1991. Elastin degradation by mononuclear phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **624**: 69-80.
56. Sibille, Y., and H.Y. Reynolds. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**: 471-501.
57. Snider, G.L., J. Kleinerman, W.M. Thurlbeck, and Z.H. Bengali. 1985. The definition of emphysema: Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Disease Workshop. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**: 182-185.
58. Snider, G.L., E.C. Lucey, and P.J. Stone. 1986. Animal models of emphysema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **133**: 149-169.

59. Snider, G.L., D.E. Ciccolella, S.M. Morris, P.J. Stone, and E.C. Lucey. 1991. Putative role of neutrophil elastase in the pathogenesis of emphysema. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **624**: 45-59.
60. Snider, G.L. 1992. Emphysema: The first two Centuries-and beyond: A historical overview, with suggestions for future research: Part 2. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**: 417-433.
61. Starcher, B.C. 1986. Elastin and the lung. *Thorax.* **41**: 577-585.
62. Stockley, R.A. 1995. Biochemical and cellular mechanism. En: Calverley, P., and N. Pride. (eds). *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Chapman & Hall Medical, London. p. 93-133.
63. Travis, J., A. Dubin, J. Potempa, W. Watorek, and A. Kurdowska. 1991. Neutrophil proteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **624**: 81-86.
64. Tschesche, H., V. Knäuper, S. Krämer, J. Michaelis, R. Oberhoff, and H. Reinke. 1992. Latent collagenase and gelatinase from human neutrophils and their activation. *Matrix*. (Suppl 1): 245-255.
65. Turino, G.M. 1985. The lung parenchyma- A dynamic matrix. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**: 1324-1334.
66. Turino, G.M. 1991. Natural history and clinical management of emphysema in patients with and without α_1 -antitrypsin inhibitor deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **624**: 18-29.
67. Weibel, E.R., and R.G. Crystal. 1991. Structural organization of the pulmonary interstitium. En: Crystal, R.G., J.B. West, *et al.* (eds). *The Lung: Scientific Foundations*. Raven Press, Ltd., New York. p. 369-380.
68. Werb, Z., and C.M. Alexander. 1993. Proteinases and matrix degradation. En: Kelley, W.N., *et al.* (eds). *Textbook of Rheumatology*. W.B. Saunders Co. USA. p. 248-268.
69. Willenbrock, F., and G. Murphy. 1994. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **150**: 165-170.
70. Woessner, J.F. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* **5**: 2145-2154.

71. Woessner, J.F. 1994. The family of matrix metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **732**: 11-21.
72. Wright, J.L., and A. Churg. 1990. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**: 1422-1428.
73. Wright, J.L., and A. Churg. 1995. Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Moll. Physiol.)* **268**: L17-L20.
74. Yurchenco, P.D., and J.C. Schittny. 1990. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* **4**: 1577-1590.