



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

00322

41

FACULTAD DE CIENCIAS

"ANALISIS DE LA EXPRESION DE LAS COLAGENASAS 1, 2, Y 3 EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA PULMONAR EN RATAS FUMADORAS."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO CHECA CARATACHEA



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANNIE PARDO SEMO

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2003

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



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.

# **PAGINACION DISCONTINUA**



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Marco Antonio  
Checa Caratachea  
 FECHA: 23 junio 2003  
 FIRMA: [Firma]

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
 Facultad de Ciencias  
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Análisis de la expresión de las colagenasas 1, 2, y 3 en un modelo experimental de enfisema pulmonar en ratas fumadoras."

realizado por Checa Caratachea Marco Antonio.

con número de cuenta 09424990-1, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dra. Annie Pardo Semo. [Firma]

Propietario

Biol. Victor Manuel Ruiz López. [Firma]

Propietario

Biol. Jorge Antonio García Alvarez. [Firma]

Suplente

M. en C. Moisés Eduardo Selman Lama. [Firma]

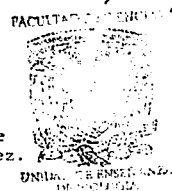
Suplente

M. en C. María de los Remedios Josefina Ramírez Rangel. [Firma]

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Consejo Departamental de Biología.

[Firma]  
 M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.



***Dedicada con gran amor a mis  
padres y hermanas. Gracias  
por su apoyo y su comprensión  
en los momentos difíciles. Sin  
ustedes no lo hubiera logrado. Los  
quiero y admiro mucho.***

**Antes que nada agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios en esta gran institución.**

**Quiero dar las gracias en especial a la Dra. Annie Pardo por abrirme las puertas de su grupo de trabajo, y así poder llevar a cabo este proyecto de tesis, mis respetos y admiración para usted es una gran persona y excelente profesional.**

**Quiero agradecer a Victor Ruíz que me ayudo en gran parte del proyecto, gracias por todo lo que me has enseñado, y sobre todo gracias por la amistad y confianza que me has brindado.**

**De igual forma a Remedios Ramírez por darme las bases necesarias para la realización del proyecto.**

**Al Dr. Selman por darme la oportunidad de realizar el proyecto en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, gracias por su apoyo.**

**Por último a mis compañeros de trabajo y amigos, Rafael Reynoso, Saúl Soberanes, Dra. Carmen Navarro, Ignacio Páramo, Erika López, Iliana Herrera, Jorge García, Tania Hurtado, David Pérez, y al grupo de trabajo en general, gracias por su amistad y apoyo.**

## RESUMEN.

La matriz extracelular (MEC) es esencial para mantener la estructura y función de los órganos, entre ellos el pulmón; un desequilibrio entre la síntesis y degradación de las moléculas de la MEC puede resultar en condiciones patológicas como la fibrosis y enfisema pulmonar.

La degradación de las proteínas de la MEC se realiza fundamentalmente por enzimas proteolíticas que se les conocen como metaloproteinasas de matriz (MMPs). Estas se han clasificado en 6 subgrupos diferentes, que son las: Colagenasas, Gelatinasas, Estromelisinias; Matrilisinias, MMPs tipo membrana (MT-MMPs) y otras MMPs.

Dentro del subgrupo de las colagenasas se encuentran tres miembros: La colagenasa 1 (MMP-1) expresada por fibroblastos, macrófagos y células epiteliales; la colagenasa 2 (MMP-8) expresada principalmente por neutrófilos y la colagenasa 3 (MMP-13) expresada por una gran variedad de células. Las colagenasas tienen como sustrato colágenas fibrilares tipo I, II, III.

En murinos la degradación de colágena fibrilar en tejidos ha sido atribuida a la actividad de la colagenasa 3, sin embargo, recientemente se han descrito y clonado la colagenasa 1 (MMP-1) y la colagenasa 2 (MMP-8) en murinos. La MMP-1 solo se ha encontrado en condiciones fisiológicas en embriones y no en estado adulto.

El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión por RT-PCR de las colagenasas 1, 2 y 3 en tejido pulmonar de ratas expuestas a humo de cigarro, con el fin de analizar si en murinos adultos en condiciones patológicas se expresan las colagenasas 1 y 2. Se escogió este modelo ya que se ha reportado que en pacientes con enfisema pulmonar y en un modelo experimental de enfisema pulmonar en cobayos existe una importante participación de colagenasas, principalmente de la MMP-1. Los resultados de RT-PCR mostraron un incremento en la expresión de MMP-8 y MMP-13 en ratas expuestas al humo del cigarro con respecto al grupo de las ratas control, mientras que la expresión de la colagenasa 1 (MMP-1) no se detectó ni en el grupo experimental ni en el grupo control, sugiriendo que en el pulmón de ratas adultas la MMP-1 no se expresa en condiciones normales, ni en condiciones patológicas. Un hallazgo interesante fue que las colagenasas 2 y 3 se sobreexpresan en este modelo experimental y sugiere que estas enzimas participan en el daño inducido por humo de tabaco en ratas.

# **“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS COLAGENASAS 1, 2, Y 3 EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA PULMONAR EN RATAS FUMADORAS”**

## **INTRODUCCIÓN**

### **METALOPROTEINASAS DE MATRIZ Y SUSTRATOS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR**

La matriz extracelular (MEC) es una estructura dinámica que no sólo constituye un soporte estructural que determinan la histoarquitectura específica para cada órgano sino que regula el comportamiento de las células que se encuentran en contacto con ella, afectando así su desarrollo, adhesión, migración, forma y funciones metabólicas. Las células se unen a la matriz extracelular a través de receptores de superficie de la familia de las integrinas, desencadenando señales de transducción que afectan diversas funciones celulares (1, 2). Además la MEC participa activamente en la presentación de una gran variedad de factores de crecimiento. En este contexto el recambio altamente controlado de la MEC es crítico para mantener la estructura y función de los órganos entre ellos la del pulmón (3).

El desequilibrio entre la síntesis y degradación de las moléculas de la MEC está bien documentado en diferentes condiciones patológicas como es el caso de la fibrosis y del enfiseма pulmonar (3). La degradación de la MEC se realiza por enzimas proteolíticas que pueden actuar tanto a nivel de membrana como extracelularmente, y a estas enzimas se les conoce como metaloproteinasas de matriz (MMP's de su abreviatura en inglés *Matrix metalloproteinases*), estas, comprenden una gran familia de metaloenzimas que poseen características estructurales comunes (4-7).

A la fecha se han sido identificado 23 diferentes MMP's de vertebrados (Tabla 1), y se han clasificado basándose en la especificidad por el sustrato y en características estructurales de los dominios (5, 6).



Una MMP debe tener al menos dos dominios conservados, uno llamado pro-dominio y el dominio catalítico (Figura 1).

El prodominio de una típica MMP es de cerca de 80 aminoácidos, y todas las MMP's, excepto MMP-21 y CA-MMP, contienen la secuencia consenso PRCXXPD.

El dominio catalítico (de 170 aa aproximadamente) contiene un sitio activo con  $Zn^{2+}$ , que se une a tres histidinas conservadas en la secuencia HEXXHXXGXXHS/TXXXXXXM, la cual también contiene una metionina conservada al lado carboxilo del sitio de unión al zinc. En el estado inactivo, el residuo conservado cisteína en el prodominio provee el cuarto sitio de coordinación para el ión de zinc catalítico, y la ruptura de este puente es necesaria para la actividad enzimática (4-8).

Además de las dos regiones conservadas, las MMP's tienen una variedad de dominios especializados que contribuyen a la especificidad del sustrato y reconocimiento o interacción con otras proteínas o moléculas.

Las MMP's tienen una región de unión bisagra, la cual es rica en prolina, y un dominio carboxilo terminal tipo hemopexina (de 120 aa aproximadamente), esto con excepción de matrilisina, CA-MMP, y endometasa-matrilisina. El dominio tipo hemopexina es requerido para la actividad de triple helicasa. Además se ha demostrado que el dominio hemopexina juega un papel funcional en la unión al sustrato y en interacciones con los TIMP's (4-9).

Dependiendo de las características estructurales y funcionales las MMP's se han clasificado en 6 subgrupos diferentes de miembros cercanamente relacionados que poseen afinidad de sustrato que en ocasiones se sobrelapa, estos subgrupos son: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMP's tipo membrana (MT-MMP's), y otras MMP's (Tabla 1).

ESQUEMA DE DOMINIOS

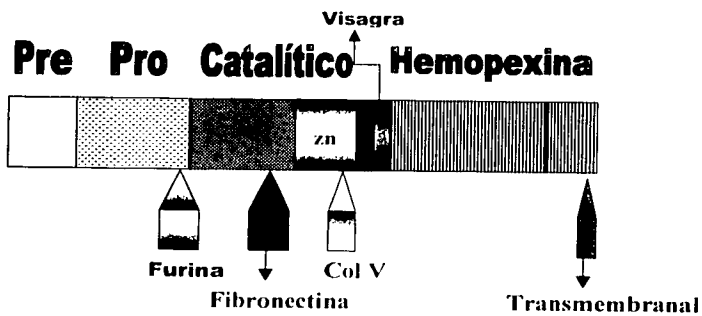


Figura 1

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 1.****Metaloproteinasas de matriz (MMP's)**

<b>Subfamilia</b>	<b>MMP</b>	<b>Nombre común</b>
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa -1 (colagenasa de fibroblastos o intersticial.)
	MMP-8	Colagenasa -2 (colagenasa de neutrófilos.)
	MMP-13	Colagenasa -3 (colagenasa de rata).
	MMP-18*	Colagenasa -4
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A (colagenasa de 72 kDa tipo IV).
	MMP-9	Gelatinasa B (colagenasa de 92 kDa tipo IV).
Matrilisinas	MMP-7	Matrilisina 1
	MMP-26	Endometasa o matrilisina 2.
Estromelisinias	MMP-3	Estromelisinina 1 (transina-1)
	MMP-10	Estromelisinina 2 (transina-2)
	MMP-11	Estromelisinina 3
MMP's tipo membrana	MMP-14	MT1-MMP
	MMP-15	MT2-MMP
	MMP-16	MT3-MMP
	MMP-17	MT4-MMP
	MMP-24	MT5-MMP
	MMP-25	MT6-MMP (Leucolisina)
Otras	MMP-12	Metaloclastasa de macrófagos.
	MMP-19	
	MMP-20	Enamelisina.
	MMP-23	CA-MMP
	MMP-27	
	MMP-28	Epilisina

\*Colagenasa-4 fue aislada de *Xenopus*, y hasta el momento no se ha encontrado su homólogo en mamíferos.

## Colagenasas:

Esta subfamilia comprende en humanos 3 miembros: la colagenasa-1 (MMP-1) la cual es expresada en su mayor parte por fibroblastos, macrófagos y células epiteliales; la colagenasa 2, (MMP-8) que se expresa principalmente por neutrófilos; y la colagenasa 3 (MMP-13) expresada por una gran variedad de células. Las colagenasas tienen como sustrato colágenas fibrilares tipos I, II y III (10,11).

- Las colágenas fibrilares son los componentes estructurales más abundantes de la matriz extracelular, y son moléculas homo o heterodiméricas, cuyas subunidades las cadenas  $\alpha$ , son el producto de diferentes genes. estas cadenas varían en un tamaño que va de 600 a 3000 residuos de aminoácidos. Las cadenas  $\alpha$  contienen uno o más segmentos de polipéptido con múltiples secuencias repetidas Gly-X-Y, donde cerca del 30% de las posiciones X y Y están ocupadas por prolina e hidroxiprolina respectivamente. Esta secuencia, resulta en una estructura secundaria de triple hélice que le brinda a la molécula estabilidad y rigidez. Una colágena fibrilar clásica contiene en más de un 95% de su estructura secundaria la de triple hélice (12-14). En el pulmón las colágenas tipo I, II, y III constituyen el 95% de la colágena y se encuentran en el intersticio pulmonar, en las paredes de las vías aéreas y en los vasos sanguíneos, mientras que la colágena tipo II se localiza principalmente en el cartilago bronquial. (1, 2). Un aspecto relevante del metabolismo de las colágenas fibrilares es que son resistentes a la degradación de la mayoría de las proteasas. Como se señaló anteriormente las colagenasas son las enzimas responsables de degradar este tipo de sustrato.

En murinos la degradación de colágena fibrilar en tejidos ha sido atribuida principalmente a la actividad de la colagenasa-3 (MMP-13), ya que durante largo tiempo fue la única colagenasa encontrada en rata y ratón (8). Recientemente se han descrito y clonado la colagenasa-2 (MMP-8) y la

colagenasa-1 (MMP-1) en murinos (10, 11). Sin embargo, la MMP-1 solo se ha encontrado en condiciones fisiológicas en embriones y en estado adulto no se ha identificado su expresión.

### **Gelatinasas:**

Esta subfamilia comprende 2 miembros: la gelatinasa A o colagenasa tipo IV de 72 kDa (MMP-2) y la gelatinasa B de 92 kDa (MMP-9), estas enzimas degradan colágena tipo IV que es la colágena de membranas basales y elastina. Reciben el nombre de gelatinasas debido a su capacidad para degradar gelatina (colágena desnaturalizada). (6-9)

- La colágena tipo IV fue la primera colágena no fibrilar extensamente estudiada y es un componente de las membranas basales, donde forma una fina red de cordeles entrelazados que atrapan a moléculas de gran tamaño como laminina o el proteoglicano heparán sulfato. Las cadenas de colágena tipo IV son estructuralmente similares y combinan un dominio largo en triple hélice con un dominio globular complejo en el extremo carboxilo terminal, que es una estructura laminar con una porción en triple hélice. (1, 12-15)
- La elastina es una proteína fuertemente hidrofóbica que se sintetiza en forma soluble (tropoclastina) y sufre varias modificaciones postraduccionales. Esta proteína se empaqueta y se transporta a sitios específicos de la superficie celular donde se producen las uniones cruzadas y el ensamble final para la formación de las fibras elásticas. Las fibras elásticas desempeñan un papel fundamental en la estructura de las matrices intersticiales y en la organización tisular. Dependiendo del tejido, por un lado otorgan la flexibilidad apropiada, y por otra, permiten la resistencia a los procesos de estiramiento. En este sentido, estas fibras se encuentran en cantidades significativas en aquellos tejidos en los cuales la extensibilidad reversible es importante en su función como ocurre con el pulmón, la piel y las grandes arterias. (15).

### **Matrilisinas.**

En esta subfamilia se encuentran la matrilisina (MMP-7) y la matrilisina-2 (MMP-26), las cuales han perdido el dominio carboxilo terminal, es decir, sólo contienen los primeros tres dominios que les confieren las propiedades necesarias para la secreción, latencia y actividad catalítica. Los sustratos de estas enzimas son muy amplios y variados y degrada entre otras moléculas de la matriz a la fibronectina. (16).

- Las fibronectinas constituyen una familia de glucoproteínas multifuncionales, que se pueden encontrar tanto en forma insoluble en la MEC, como en forma soluble circulando en el plasma. Las moléculas de fibronectina están formadas por 2 subunidades de 230 y 250 kDa que se encuentran ligadas por uniones de disulfuro. La estructura de la fibronectina está fuertemente conservada en la escala evolutiva y es altamente repetitiva con 3 unidades básicas, denominadas homología tipos I, II y III, las cuales constituyen el esqueleto de la proteína. Interviene estableciendo las conexiones que utilizan las células cuando éstas migran a través de la matriz extracelular. Además es la principal proteína de unión entre las células y las fibras colágenas.(15)

### **Estromelisininas.**

A esta subfamilia pertenecen las estromelisininas 1 (MMP-3), 2 (MMP-10) Y 3 (MMP-11), teniendo como sustratos principales a la fibronectina, laminina y colágena tipo IV. (6, 9, 16)

- La laminina es una glicoproteína filamentosa y es abundante en las láminas basales de las matrices extracelulares embrionarias. Tiene una estructura altamente conservada en diferentes especies como en el hombre, ratón, drosophila, sanguijuelas, y estrellas de mar. Consiste de tres

cadenas polipeptídicas  $\alpha$  (400kDa), B1 (220kDa) y B2 (205kDa) unidas por enlaces disulfuro para formar una estructura en forma de cruz con terminaciones globulares. Existen diversas formas de laminina y los cambios en la composición de subunidades de laminina pueden influir no solo en la interacción con los receptores celulares sino también en la interacción con otras moléculas de la matriz y por lo tanto en la arquitectura de la membrana basal (15, 17).

### **MMP's tipo membrana (MT-MMP).**

A esta subfamilia la conforman 6 miembros diferentes MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP (MMP-17), MT5-MMP (MMP-24), MT6-MMP (MMP-25). Son proteínas con un dominio de membrana y una cola citoplasmática, y un dominio de furina que sirve como sitio activo de reconocimiento para su activación intracelular. Estas enzimas tienen la capacidad de activar a otras MMP's como la MMP-2 y 13, además de degradar proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, laminina, colágena, gelatina y otras. (18)

### **Otras MMP's.**

En esta subfamilia se agrupan aquellas enzimas cuyas propiedades no les permite agruparse dentro de las subfamilias anteriores en este grupo encontramos a MMP-12 (metaloclastasa de macrófagos), MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-27, MMP-28. (4, 8, 18)

### **REGULACIÓN DE LAS MMP's**

La regulación en las MMP's ocurre tanto intra como extracelularmente y la actividad enzimática es el resultado final de una compleja serie de eventos que incluye la expresión del gen, la activación del zimógeno y la inhibición enzimática en el espacio extracelular (4, 18).

La expresión génica es regulada por una variedad de citocinas, tales como factores de crecimiento y mediadores inflamatorios los cuales pueden incrementar o disminuir la síntesis de la enzima en una célula específica. Citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la interleucina-1 (IL-1), son capaces de aumentar la expresión de las MMP's a través de una combinación de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales.(4, 18)

A nivel de activación, las MMPs se regulan a través de la digestión parcial del dominio propeptídico. 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 un residuo de Cys y el Zn<sup>2+</sup> y la conformación de la proteína cambia, permitiendo así el proceso autocatalítico hacia la forma activa. Los activadores fisiológicos de muchas de estas enzimas no se conocen con precisión; sin embargo, se ha sugerido la existencia de una cascada en la que algunos de los miembros de la familia de las MMPs tienen la capacidad de activar a otros miembros de la misma familia. En el caso de la progelatinasa A (MMP-2), la activación se lleva a cabo en la superficie celular y las metaloproteinasas de membrana desempeñan un papel central mediante un complejo mecanismo que involucra a la MT1-MMP, y al TIMP-2 (4, 18, 19).

Finalmente a nivel de regulación por inhibición, los principales inhibidores fisiológicos de las MMP's son una familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), de los cuales se han descrito cuatro tipos diferentes llamados TIMP-1, 2, 3 y 4. Los TIMP's forman complejos de alta afinidad con las formas activas de MMP's e inhiben su actividad enzimática a través de una interacción no covalente. Estos inhibidores tienen entre otras propiedades, las de ser moduladores de la proliferación, promotores del crecimiento celular, inhibidores de la angiogenesis, apoptosis, etc.(18-20).



## **IMPORTANCIA DE LAS COLAGENASAS EN EL ENFISEMA PULMONAR**

El enfisema pulmonar pertenece a un síndrome clínico llamado Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) causada en un 80% de los casos por el consumo crónico de tabaco. Es una enfermedad degenerativa y potencialmente mortal, los pulmones pierden su elasticidad debido a la rotura del tejido elástico y las paredes entre los alvéolos son destruidas, de manera que los alvéolos son sustituidos por grandes espacios aéreos. El espacio muerto fisiológico aumenta grandemente y debido a la ventilación y riego alveolar no uniformes e inadecuadas, se desarrolla hipoxia grave. La inspiración y la espiración son difíciles y el trabajo respiratorio se incrementa gradualmente. El tórax se agranda y toma la forma de barril porque la pared torácica se expande cuando el recogimiento elástico opONENTE de los pulmones declina. (21, 22).

La matriz extracelular es esencial para la integridad del pulmón y cuando ésta es perturbada puede provocar cambios estructurales como sucede en el enfisema pulmonar. Se cree que la etiología del enfisema es debido a un imbalance entre proteasas y antiproteasas en el pulmón. Estudios anteriores se han enfocado sobre las enzimas elastolíticas como agentes primarios de la patogénesis, sin embargo, estudios recientes sugieren que las colagenasas pueden estar también involucradas en la destrucción del tejido pulmonar en el enfisema. (23-25).

### **Hipótesis elastasa – antielastasa.**

Se sabe que fumar cigarrillos es la principal causa del enfisema, sin embargo el mecanismo por el cual el humo del cigarro produce una destrucción en la arquitectura del pulmón no es bien conocido aún. La elastina es un componente de la matriz extracelular, que proporciona la flexibilidad necesaria sobre el pulmón para resistir los diferentes daños fisiológicos a los que está sometido. Por 30 años se ha creído

que el enfisema es el resultado de un imbalance elastasa- antielastasa (26), esto se formuló después de que se notó que fumadores con una deficiencia congénita de  $\alpha$ -1 antitripsina tenían una excesiva incidencia de enfisema.(27). Dado el incremento de contenido de neutrófilos visto en pulmones de fumadores y el hecho de que la  $\alpha$ -1 antitripsina inactiva a la neutrófilo elastasa, se creyó que la degradación de elastina por esta vía (neutrófilo elastasa) era el factor responsable del desarrollo del enfisema pulmonar. Sin embargo, recientemente se ha cuestionado esta hipótesis por varias razones. No todos los pacientes con deficiencia congénita de  $\alpha$ -1 antitripsina que fuman desarrollaron enfisema, y pacientes que tienen una deficiencia parcial no tienen un elevado riesgo de enfisema, además se ha demostrado que el número de neutrófilos no se correlaciona con la destrucción del parénquima en el enfisema, y que el exceso de elastasa o la deficiencia de su inhibidor en fumadores inducidos no siempre produce enfisema.(28-32).

Por otra parte, se realizó un estudio en un ratón que no expresaba metaloelastasa (MMP-12) y que tenía un fenotipo normal de pulmón, en el cual, cuando los animales KO eran expuestos a humo de cigarro no desarrollaban cambios enfisematosos en el pulmón como lo hacían los ratones silvestres. Este estudio sugirió que el macrófago es crucial para el desarrollo del enfisema ya que en el modelo de ratones fumadores en ausencia de estas células no se desarrolló enfisema (33).

### **Colagenasas en el enfisema.**

La colágena fibrilar, otro componente de la matriz extracelular, es vital para mantener la arquitectura normal del pulmón, las fibras de colágena de tipo I y III están distribuidas en gran parte del pulmón y de estas la colágena tipo I es la más abundante comprendiendo de 50-60% de la matriz extracelular (3,4). La colágena está presente en el adventicio de las arterias pulmonares, en el intersticio del árbol bronquial, en la septa interlobular, en la lámina bronquial y en el intersticio alveolar, donde se sabe que

ocurren los cambios patológicos en el enfisema (25). Se ha demostrado que la colágena es degradada o dañada en enfisema pulmonar, y con esto se han derivado estudios, los cuales sugieren que las colagenasas están involucradas en varias enfermedades pulmonares. Por otra parte se ha mostrado en modelos de enfisema inducidos por elastasa, que la colágena es degradada rápidamente, además se ha observado en ratas, que cortas exposiciones a cantidades tóxicas de oxígeno produce cambios enfisematosos y degradación de colágena sin cambios en la elastina.(25, 32, 34-36)

Un estudio que muestra la importancia de la colágenasa en el enfisema fue llevado a cabo en una línea de ratones transgénicos que expresaban colagenasa 1 (MMP-1) humana. Estos ratones mostraron un fenotipo con enfisema pulmonar sin mostrar cambios en el contenido de elastina en el pulmón, siendo esta la primera vez que se demostraba un mecanismo independiente de elastina. (37).

Mientras algunos investigadores han reportado una pérdida de colágena sin pérdida de elastina en el enfisema, otros han reportado que la cantidad de colágena se ve incrementada en las regiones septales de pacientes enfisematosos. Esto podría indicarnos una degradación de la colágena seguido por una rápida reparación, incrementando el depósito de colágena en el pulmón, provocando así un daño más severo en los pacientes debido a una fuerza de distensión en los pulmones (32, 38)

En los últimos años, han surgido diversos estudios acerca de la importancia de las colagenasas en el enfisema pulmonar, un ejemplo claro es un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo en un modelo experimental en cobayos expuestos a humo de tabaco. En este modelo se demostró que exposición a humo de cigarro en cobayos causaba un incremento en la expresión de colagenasas y aumentaba la actividad colagenolítica en los pulmones. Este aumento de colagenasas esta asociado con un decremento en la concentración de colágena en pulmón de cobayo expuestos al humo de cigarro.

Además por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica se mostró la expresión de colagenasa en macrófagos alveolares, células epiteliales y fibroblastos (39).

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado también la presencia de MMP-1 en el parénquima del pulmón de pacientes con enfisema. Cuando se examinaron tejidos de pulmón de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica se encontró un incremento en la expresión de las colagenasas 1 y 2, además de realizar estudios inmunohistoquímicos donde se reveló que la colagenasa 1 estaba presente en macrófagos alveolares e intersticiales, células endoteliales, y células epiteliales. (40)

Tomando en consideración que se sostiene que en murinos la colagenasa-3 es la colagenasa que se expresa fundamentalmente y que recientemente se ha mostrado la expresión de la MMP-1 en embriones de roedores, el objetivo de este trabajo es analizar si en condiciones patológicas representadas por exposición a humo de tabaco las ratas expresan las colagenasas MMP-1, MMP-8 y MMP-13.

#### **OBJETIVO:**

Analizar por RT-PCR la expresión de la MMP-1, MMP-8 y MMP-13 en pulmones de ratas control y de ratas expuestas a humo de tabaco.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Modelo Experimental.**

Se utilizaron 12 ratas hembra cepa Wistar con un peso inicial de entre 220 y 250 grs., las cuales recibieron una dosis de 10 cigarros al día. Administrándose 3 cigarros en un lapso de 30 minutos y después de un descanso de 30 minutos se repitió la misma dosis con su respectivo descanso, y finalmente 4 cigarros en 30 minutos. Los animales se colocaron en una cámara de acrílico y en el lapso de media hora que les dio de descanso a los animales la cámara se abrió al aire.

### **Población de estudio.**

Los animales se dividieron en dos grupos, un grupo de 8 animales que es el grupo experimental, y otro grupo de 4 animales que es el grupo control, los animales se sacrificaron a las seis semanas de tratamiento. El grupo control no recibió ningún tratamiento.

Adicionalmente se utilizaron embriones de rata de 12 días de gestación, como controles positivos para la colagenasa 1 (MMP-1).

### **Obtención del material biológico.**

Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico para realizar toracotomía. Los pulmones se perfundieron con una solución salina de buffer de fosfatos (PBS) a través de la arteria pulmonar para eliminar la sangre de los capilares pulmonares. Posteriormente se pinzó el bronquio izquierdo y se seccionó para separar el pulmón, el cual se congeló en nitrógeno líquido. El pulmón derecho fue instilado por vía intratraqueal con una solución de formaldehído al 4% disuelto en PBS y se dejó fijando en la misma solución.

### **Extracción de RNA.**

Se extrajo el RNA total de una fracción del pulmón que se conservó en nitrógeno líquido, así como del embrión de rata de 12 días de gestación de acuerdo al método de TRIZOL (Life Technologies), este reactivo es una solución que contiene fenol e isotiocinato de guanidina. Este método está basado en la técnica de extracción de RNA de Chomczynsky y Sacchi y se desarrolla de la siguiente manera: (41)

1) **Homogenización:** se pesó la fracción de pulmón que se había conservado en el nitrógeno líquido y por cada 75 mg. de tejido se le agregó 1 ml de TRIZOL, posteriormente se homogenizó con el politrón (Kinematica 10-35).

2) **Separación de la fase acuosa:** las muestras homogenizadas fueron incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo por cada 1 ml de TRIZOL agregado, se mezcló por un lapso de 2 minutos y se incubaron nuevamente a temperatura ambiente durante 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000 x g a 4° C durante 16 minutos. Al término de la centrifugación se recuperó la fase acuosa.

3) **Precipitación del RNA:** la fase acuosa que se recuperó en el paso anterior fue transferida a un nuevo tubo, al cual se le adicionó 500µl de isopropanol por cada 1ml de TRIZOL agregado y se dejó precipitando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 12000 x g a 4° C por 11 minutos.

4) **Lavado del RNA:** después de la centrifugación se decantó el sobrenadante y al precipitado se le adicionó 1 ml de etanol al 75% por cada 1ml de TRIZOL agregado. Nuevamente se centrifugaron las muestras a 7500 x g a 4° C por 5 minutos y el sobrenadante se decantó y se dejó secar, finalmente se resuspendió en 50 µl de agua DEPC (Diethyl Pirocarbonato).

#### **Transcripción reversa (RT).**

Un microgramo de RNA total extraído con el reactivo de TRIZOL fue tratado con 1 Unidad de DNAsa. Se utilizó el kit *RT for PCR* (Advantage) para transcribirlo a DNA complementario (cDNA). Se preparó una mezcla de RT teniendo la siguiente composición:

- a) Enzima MuLV (2.5 u/µl).
- b) 1mM de mezcla de cada nucleótido.
- c) Inhibidor de RNAsas 1u/µl.
- d) Hexámeros al azar.
- e) Buffer de RT 1X.

**Procedimiento:**

- 1) A 1 microgramo de RNA se le agregó DNAsa.
- 2) Los tubos fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente, esto con el fin de que la DNAsa degrade el DNA genómico contenido en cada muestra.
- 3) Se agregó 1 µl de hexámeros (2.5 µM) y se incubó 2 minutos a 70° C, esto para que los hexámeros hibridarán con el RNA templado y desnaturalizar la DNAsa.
- 4) Se incubó inmediatamente en hielo de 2 a 3 minutos.
- 5) Se agregó la mezcla de RT para iniciar la reacción de polimerización por la enzima (transcriptasa reversa) a una temperatura de 42 °C durante 1 hora. Y finalmente se desnaturalizó la enzima transcriptasa reversa a una temperatura de 94° C por 5 minutos.
- 6) El cDNA obtenido se diluyó en 30 µl de agua DEPC.



### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para identificar la expresión de las colagenasas 1, 2 y 3 se utilizaron *primers* (del inglés primer = iniciador) específicos para cada una de éstas, además de una mezcla específica con un volumen final de 25µl (aforada con H<sub>2</sub>O).

	COLAGENASA 1	COLAGENASA 2	COLAGENASA 3	GAPDH
Mg Cl <sub>2</sub>	2.5 mM	2 mM	1.5 mM	1 mM
Buffer de PCR 10X	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
Mezcla de nucleótidos	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM
Primer sense	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
Primer antisense	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
H <sub>2</sub> O	-----	-----	-----	-----
Taq Gold Polimerasa	1.25 unidades	1.25 unidades	1.25 unidades	1.25 unidades

Los *primers* específicos para la MMP-1 fueron:

Sentido. 5' AGA CTT CCC TGG AAT TGA TGA T 3'

Antisentido. 5' ATG TAT CAG CAC TTC TGG AAG GT 3'

Los *primers* fueron obtenidos de la referencia (10).

Para este par de *primers* se espera un producto de 267 pb.

95° C	95° C	55° C	72° C	72° C
10 minutos	30 segundos	45 segundos	45 segundos	10 minutos

50 CICLOS

Los *primers* específicos para la MMP-8 fueron:

Sentido. 5' CCC ACC TGA GAT TTG ATG CT 3'

Antisentido. 5' TTG CTG CAA GTC ATA GGC AC 3'

Este par de *primers* fueron diseñados en el siguiente sitio:

<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/prima.html>

Para este par de *primers* se espera un producto de 246 pb.

95° C	95° C	58° C	72° C	72° C
10 minutos	30 segundos	30 segundos	30 segundos	10 minutos

35 CICLOS

Los *primers* específicos para la MMP-13 fueron:

Sentido. 5' GAG GTG AAA AGG CTC AGT GC 3'

Antisentido. 5' ATG AGG CGG GGA TAG TCT TT 3'

Este par de *primers* fueron diseñados en el siguiente sitio:

Para este par de *primers* se espera un producto de 136 pb.

95° C	95° C	64° C	72° C	72° C
10 minutos	30 segundos	30 segundos	30 segundos	10 minutos

40 CICLOS

Los *primers* específicos para GAPDH fueron:

Sentido. 5' CCC CTT CAT TGA CCT CAA CT 3'

Antisentido. 5' TTG TCA TGG ATG ACC TTG GC 3'

De igual forma este par de *primers* fueron diseñados en el siguiente sitio:

<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/prima.html>

Para este par de *primers* se espera un producto de 396 pb.

95° C	95° C	60° C	72° C	72° C
10 minutos	30 segundos	30 segundos	30 segundos	10 minutos

25 CICLOS

Para analizar el tamaño de los productos amplificados se tomaron 8  $\mu$ l de los productos de PCR, se tiñeron con bromuro de etidio y se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 %. Posteriormente fueron visualizados en un transiluminador de luz UV.

Las cantidades de cDNA amplificadas en la PCR fueron normalizadas por monitoreo de la expresión de mRNA de gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

## RESULTADOS:

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### *GAPDH*

Como se había mencionado, las cantidades de cDNA amplificadas en la PCR fueron normalizadas por monitoreo de la expresión de mRNA de gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Después de 25 ciclos se obtuvo una banda de 396 pares de bases tanto en los pulmones control como en los experimentales. Se realizó una reacción como control negativo, a la cual no se le aplicó cDNA, y en la misma no se amplificó ningún producto (Figura 1).

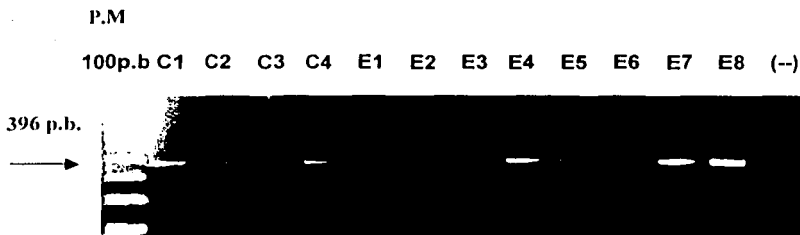


Fig. 1 Análisis de la expresión de GAPDH por RT-PCR. Teniendo un producto de 396 p.b. El primer carril muestra un marcador de 100 pares de bases, en los siguientes cuatro carriles (C1 - C4) encontramos los pulmones controles, los carriles de E1 a E8 corresponden a los pulmones experimentales, el último carril corresponde al control negativo (--).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### MMP-8

Ya normalizadas las cantidades de cDNA por monitoreo de la expresión de GAPDH se utilizaron *primers* específicos para la MMP-8. El resultado puede observarse en la Figura 2, en la cual se muestra después de 35 ciclos, un fragmento de 246 pares de bases correspondiendo al tamaño esperado. Aunque en los pulmones de ratas controles (carriles C1-C4) se amplificó el gen de la MMP-8 podemos notar que en los pulmones de las ratas experimentales (carriles E1-E8) hubo un aumento en la expresión del gen con respecto a los controles. De igual forma se utilizó un control negativo (--) para asegurarnos de que los productos amplificados no eran por contaminación, y no se obtuvo amplificación en esta reacción. Por otra parte no se obtuvieron productos inespecíficos, señalándonos que la reacción fue específica.

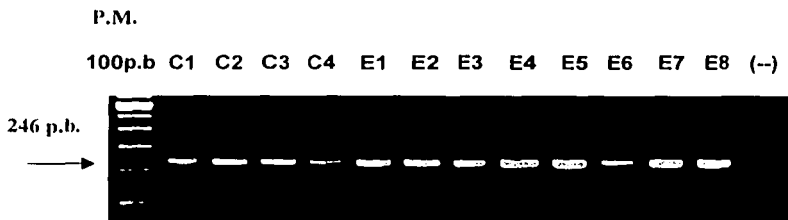


Fig. 2 Análisis de la expresión de MMP-8 por RT-PCR. Teniendo un producto de 246 p.b. El primer carril muestra un marcador de 100 pares de bases, en los siguientes cuatro carriles (C1 -- C4) encontramos los pulmones controles, los carriles de E1 a E8 corresponden a los pulmones experimentales, el último carril corresponde al control negativo (--).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **MMP-13**

Por otra parte se utilizaron primers específicos para la MMP-13 y los resultados se muestran en la figura 3. Después de 40 ciclos se obtuvo un fragmento de DNA de 136 pares de bases que corresponde al tamaño esperado tanto en los controles como en los experimentales. Sin embargo, como podemos observar en la figura se observa un incremento en la expresión del gen de la MMP-13 en los pulmones de las ratas experimentales con respecto a los pulmones de las ratas controles. No se obtuvo amplificación en la reacción del control negativo, ni se amplificaron productos inespecíficos en ninguna de las reacciones.

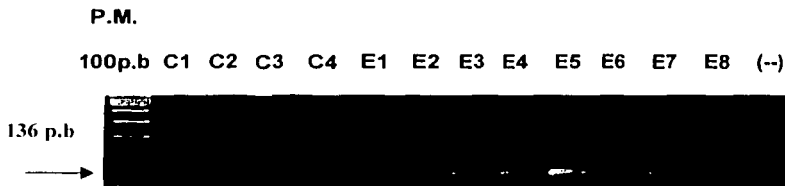


Fig. 3 Análisis de la expresión de MMP-13 por RT-PCR. Teniendo un producto de 136 p.b. El primer carril muestra un marcador de 100 pares de bases, en los siguientes cuatro carriles (C1 -- C4) encontramos los pulmones controles, los carriles de E1 a E8 corresponden a los pulmones experimentales, el último carril corresponde al control negativo (--).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **MMP-1**

Para el análisis de la expresión de la MMP-1 se utilizaron *primers* específicos, y un control positivo de embrión de rata de 12 días de gestación. Como se observa en la figura 4, después de 50 ciclos se obtuvo un producto de 267 pares de bases en el control positivo, sin embargo, en los pulmones de rata control adulto y en los pulmones de las ratas experimentales no se logró amplificar ningún producto, bajo ninguna condición. Con el objeto de aumentar la sensibilidad, adicionalmente se realizó una PCR anidada, es decir, se tomó una alícuota de los productos de una primera PCR y se usó como templado para una segunda PCR. El resultado fue igualmente negativo y solo se amplificó el control positivo de embrión de rata mientras que los en controles adultos y los pulmones experimentales no hubo ningún tipo de amplificación.

P.M.

100p.b C(+) C1 C2 C3 C4 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 (--)

→  
267 p.b



Fig. 4. Análisis de la expresión de MMP-1 por RT-PCR. Teniendo un producto de 267 p.b. El primer carril muestra un marcador de 100 pares de bases, en el siguiente carril (C+) encontramos cDNA de embrión de 12 días de gestación como control positivo, los carriles de C1 a C4 corresponden a los pulmones controles, mientras que los siguientes ocho carriles (E1 -- E8) pertenecen a los pulmones experimentales, el último carril corresponde al control negativo (--).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## DENSITOMETRÍA.

Adicionalmente se realizó una densitometría de las bandas de amplificación para determinar cuantitativamente los niveles de expresión de las MMPs estudiadas en relación al GAPDH con el objeto de analizar si existe una diferencia significativa entre la expresión de las enzimas comparando los pulmones control y con los experimentales. El resultado de los promedios y desviación estandar de los controles y los experimentales tanto para la MMP-8 como para la MMP-13 relativas al GAPDH aparecen en las figuras 5 y 6 respectivamente. En el caso de la MMP-8 el resultado es de  $4.81 \pm 2.21$  en los pulmones control, contra  $9.56 \pm 6.39$  de los pulmones experimentales. En el caso de la MMP-13 el resultado es de  $2.67 \pm 0.70$  en el caso de los pulmones control, mientras que en los pulmones experimentales el resultado fue de  $6.94 \pm 4.19$ . Aunque existen diferencias evidentes el análisis estadístico no revela significancia de los datos utilizando la *t de student* ( $p.....$ ). Esto probablemente se debe a la gran variación que existe entre los animales y al poco número de animales tanto controles como experimentales.

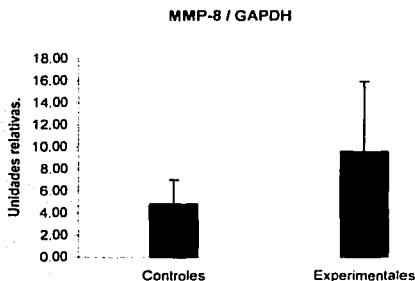


Fig. 5 Resultado de los promedios de la densitometría de la expresión de la MMP-8 comparando los pulmones control y los experimentales

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

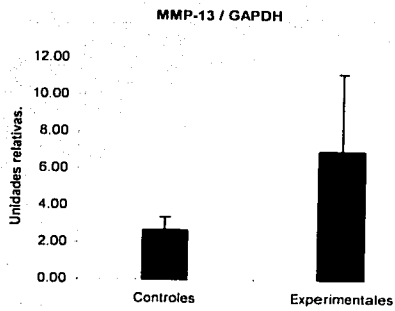


Fig. 6 Resultado de los promedios de la densitometría de la expresión de la MMP-13 comparando los pulmones control y los experimentales

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Discusión y Conclusiones.

La matriz extracelular es importante para la integridad del pulmón en condiciones normales y existe un equilibrio entre su síntesis y su degradación. Cuando esta es alterada puede producir cambios en la arquitectura del órgano como es el caso de la fibrosis pulmonar en donde hay depósito exagerado de moléculas de matriz o el caso aparentemente opuesto del enfisema pulmonar dónde hay destrucción de paredes alveolares. El enfisema pulmonar se caracteriza por una destrucción difusa de las paredes alveolares, y en la patogénesis de esta enfermedad participan una compleja red de proteasas de serina y metaloproteinasas que son capaces de degradar diferentes moléculas de la matriz extracelular, como colágena o elastina entre otras. (28,42)

Las metaloproteinasas son proteínas capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular y membranas basales y estudios recientes sugieren que el subgrupo de las colagenasas pueden estar involucradas en la destrucción de las paredes alveolares pulmonares en el enfisema. En humanos se ha demostrado que la MMP-1 y la MMP-8 están sobreexpresadas en pulmones de pacientes con enfisema pulmonar (43-44).

Aunque las colagenasas pueden degradar cualquier tipo de colágena fibrilar, existen datos que indican que la MMP-1 degrada preferentemente colágena tipo III, la MMP-8 tiene mayor afinidad por la colágena tipo I, y la MMP-13 degrada mas eficientemente a la colágena tipo II. Estos datos sugieren que las diferentes colagenasas humanas son enzimas especializadas que participan en la remodelación de tejidos con diferente composición de colágena. Por lo tanto se puede pensar que estas colagenasas podrían tener diferentes papeles funcionales tanto en procesos patológicos como fisiológicos.

La utilización de modelos animales experimentales permite analizar con mayor facilidad la participación de las diferentes enzimas *in vivo*. Sin embargo, solo recientemente se clonó la MMP-1 en murinos y su expresión se observó sólo en el embrión mientras que la expresión de la MMP-13 en murinos adultos está ampliamente documentada.

Así pues, el objetivo de este trabajo fue el de analizar la expresión de la MMP-1, MMP-8 y MMP-13 en ratas expuestas a condiciones de daño pulmonar como es el caso de la exposición a humo de tabaco.

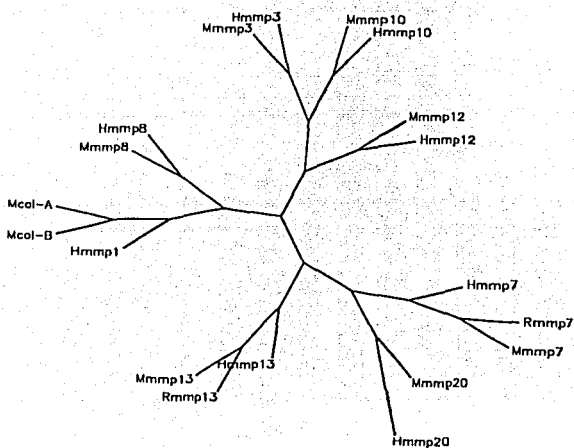
El hecho de que la MMP-1 no se logró amplificar en los pulmones control ni en los experimentales sometidos a la exposición a humo, y únicamente se logró amplificar este producto en el embrión de rata de 12 días de gestación sugiere que la MMP-1 está funcionalmente sustituida en tejidos adultos murinos por otras enzimas con actividad colagenolítica como la MMP-8 y la MMP-13. Es interesante señalar que ortólogos de la MMP-1 se han identificado en varias especies entre las que se incluye *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Oryctolagus cuniculus*, y *Rana catesbiana*

Por PCR, observamos que en los pulmones de los animales patológicos existe una sobre expresión de la MMP-13 y la MMP-8 con respecto a los pulmones de los controles, aunque, para la MMP-13 parece ser mas marcada esta diferencia, esto lo podemos corroborar con la densitometría realizada tanto para MMP-8 como para MMP-13, y aunque realizando pruebas estadísticas no se encuentra una diferencia significativa, seria interesante realizar un futuro un experimento en el cual se pueda cuantificar la expresión de ambas enzimas, esto con ayuda de la RT-PCR en tiempo real la cual tiene la ventaja de cuantificar la cantidad inicial de templado mas específicamente que otras técnicas.

En los últimos años se ha debatido sobre la identidad de las enzimas colagenolíticas producidas por los tejidos de murinos. Ha sido sorprendente que la presencia de la colagenasa MMP-1 no se había

reportado hasta el estudio reciente de Balbín y colaboradores (10). Mas aún los ortólogos de MMP-1 han sido clonados e identificados en varias especies incluyendo *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Oryctolagus cuniculus*, and *Rana catesbiana* (50-53). Datos en el laboratorio sugirieron que La MMP-1 se encuentra presente en cobayos y una secuencia parcial de la MMP-1 de cobayo también se ha reportado, aunque los cobayos se han relacionado mas cercanamente con los lagomorfos que con los roedores (54).

Este hecho plantea una pregunta biológica de gran interés. En que nivel de la escala evolutiva aparece la MMP-1 y que ventaja representa poseer tres colagenasas diferentes. Porque en los murinos como rata y ratón solo se expresa en etapa embrionaria. ¿Perdieron los murinos la expresión de esta enzima?



Relación evolutiva entre MMP's humanas y de ratón.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los estudios de genómica en diferentes especies animales permitirán abordar este tipo de preguntas con mayores posibilidades.

Por otro lado un hallazgo interesante es que la MMP-13 y la MMP-8 parecen tener una expresión aumentada en aquellos animales expuestos a humo de tabaco. En experimentos posteriores se comprobará este posible hallazgo con la utilización de PCR de tiempo de real que nos permitirán cuantificar la expresión de estas enzimas.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Pardo A. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. (México)* 6:156, 1993.
2. Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* 76:253-265, 1998.
3. Pardo A., Selman M. Matriz metalloproteinases and lung injury. *Braz. J. Med. Biol., Rev.* 29: 1109-1115. 1996.
4. Pardo A. Metaloproteinasas de matriz extracelular, un delicado equilibrio entre daño y reparación. *Mensaje bioquímico XXV*. Juárez Ma, Pardo-Vázquez JP, Del Arenal p, Cea A, Piña E. edit. 169-180, 2001.
5. Massova I, Kotra L, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 12:1075-1095, 1998.
6. Woessner F. The Matrix metalloproteinases family. In *Matrix Metalloproteinase*. Ed. Parks WC, Mecham Academic Press. 1-14, 1998..
7. Birkedal - Hansen H. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4; 197-250, 1993.
8. Shapiro S.D. Matrix metalloproteinases degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10: 602-608, 1998.
9. Nagase H., Woessner B. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274:21491-21494, 1999.
10. Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Lopez JM, Alvarez J, Sanchez LM, Quesada V, Bordallo J, Murphy G, Lopez-Otin C. Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem* 276:10253-10262, 2001.
11. Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Pendas AM, Lopez JM, Jimenez MG, Murphy G, Lopez-Otin C. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem.* 273:23959-23968, 1998.
12. Brown J.C, Timpl R. The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:484- 1995.
13. Van der Rest M, Bruckner P. Collagens: diversity at the molecular and supramolecular levels. *Current Opinion in Structural Biology.* 3:430-436, 1996.
14. Van der Rest M, Garrone R. The collagen family of proteins. *FASEB J.* 5:2814-2823, 1992.

15. Pardo A, Selman M. Matriz Extracelular. en *Biología Celular y Molecular*; pág:515-543. Jiménez LF y Merchant H. eds. Prentice Hall, 2003.
16. Matrisian Lynn. The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays*. 14: 455-463, 1992.
17. Schwarzbauer JE, Sechler JL. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm from extracellular matrix assembly. *Curr. Op. Struct. Biol.* 11: 622-627, 1999.
18. Vu T. H., Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 14: 2123- 2133, 2000.
19. Birkedal-Hansen Henning. Proteolytic remodeling of Extracelular matrix. *Curr opinion in Cell Biol.* 7:728-735, 1995.
20. Willenbrock F, Murphy G. Structure-function relationships in tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 165-170, 1994.
21. Niewoehner DE. Cigarette smoking, lung inflammation and the development of emphysema. *J. Lab. Clin. Med.* 111: 15-27, 1988.
22. Streuli Charles. Extracelular matrix remodeling and cellular differentiation. *Current opinion in cell biology.* 11:634-640, 1999.
23. Foronjy R, D'Armiento J. The role of collagenase in emphysema. *Respir Res* 2:348-352, 2001.
24. William C.Parks, Steven D. Shapiro, Matriz metalloproteinases in lung injury. *Respir. Res.*, 2: 10-13, 2001.
25. Pardo A., Selman M. Proteinase – antiproteinase imbalance in the pathogenesis of emphysema: The role of metalloproteinases in lung damage. *Histol Histopathol.* 14: 227-233, 1999.
26. Fujita J, Nelson NL, Daughton DM, Dobry CA, Spurzem JR, Irino S, Rennard SI. Evaluation of elastase and anti-elastase balance in patients with chronic bronchitis and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 142:57-62, 1990.
27. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW. Smoking, lung function, and  $\alpha$ 1-AT deficiency. *Lancet* 1: 152-154, 1985.
28. Cardoso W, Harmanjatinder S, Hyde D. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 147:975-981, 1993.
29. Carp H., Miller F. Potential mechanisms of emphysema,  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 2041-2045, 1982.



30. Finkelstein R., Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am. J. Respir Crit. Care Med.* 152: 1666-1672, 1995.
31. MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in humans lungs. *N. Engl. J. Med.* 321: 924-928. 1989.
32. Jannof A. Elastases and emphysema. current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 417-433. 1985.
33. Hautamaki RD., Kobayashi DK, Senior R, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277:2002-2004, 1997.
34. Lang MR, Fiaux GW, Gillooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax* 49:319-326,1994.
35. Bienkowski RS,Gotkin MG. Control of collagen deposition in mammalian lung. *Prs. Soc. Exp. Biol. Med.* 209:229,1995.
36. Yu SY, Keller NR, Synthesis of lung collagen in hamsters with elastase-induced emphysema. *Exp. Mol. Pathol.* 29:37-43, 1978.
37. D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, Berg RA, Chada K. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* 71:955-961, 1992.
38. Gibbs DF, Warner RL., Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J. Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20:1136-1144, 1999.
39. Selman M, Montaño M, Ramos C, Vanda B, Becerril C, Delgado J, Sansores R, Barrios R, Pardo A. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am J. Physiol.* 271: L737-L743, 1996.
40. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal B, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinase a and b, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 117:684-694, 2000.
41. Chomczynski, P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1987.
42. Finlay G.A, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Matrix metalloproteinases expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J. Respir. Crit. Care Med* 156:240-247. 1997.

43. Finlay G.A., Russell K.J., McMahon KJ, D'arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax*. 52: 502-506. 1997.
44. Imai K., Dalai S, Chen E, Downey R, Schulman L, Ginsburg M, D'Armiento J. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir. Crit. Care Med* 163:786-791, 2001.
45. Goldberg G.I., Wilhelm S.M., Kronberger A., Bauer E.A., Grant G.A., Eisen A.Z. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J. Biol. Chem.* 261: 6600-6605, 1986.
46. Fini ME, Plucinska IM, Mayer AS, Gross RH, Brinckerhoff CE. A gene for rabbit synovial cell collagenase: member of a family of metalloproteinases that degrade the connective tissue matrix. *Biochemistry*. 26:6156-65, 1987.
47. Oofusa K., Yomori S., Yoshizato K. Regionally and hormonally regulated expression of genes of collagen and collagenase in the anuran larval skin. *Int. J. Dev. Biol.*, 38:345-350, 1994.
48. Tamura M, Shimokawa H, Sasaki S. Primary structure of bovine interstitial collagenase deduced from cDNA sequence. *DNA Seq.* 5: 63-6, 1994.
49. Huebner JL, Otterness IG, Freund EM, Caterson B, Kraus VB. Collagenase 1 and collagenase 3 expression in a guinea pig model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*41:877-90. 1998.
50. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J. Biol. Chem.* 261. 6600-6605. 1986
51. Fini ME, Plucinska IM, Mayer AS, Gross RH, Brinckerhoff CE A gene for rabbit synovial cell collagenase: member of a family of metalloproteinases that degrade the connective tissue matrix. *Biochemistry* 26. 6156-6165. 1987
52. Oofusa, K, Yomori S, Yoshizato K. Regionally and hormonally regulated expression of genes of collagen and collagenase in the anuran larval skin. *Int J Dev Biol* 38, 345-350, 1994
53. Tamura, M., Shimokawa, H., and Sasaki, S. Primary structure of bovine interstitial collagenase deduced from cDNA sequence (1994) *DNA Seq* 5, 63-66, 1994
54. Huebner JL, Otterness IG, Freund EM, Caterson B, Kraus VB. Collagenase 1 and collagenase 3 expression in a guinea pig model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 877-890, 1998.