



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA OSTEOPONTINA SOBRE UNA  
LÍNEA DE FIBROBLASTOS NORMAL Y UNA  
LÍNEA DE CÉLULAS EPITELIALES DE PULMÓN  
A549

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ILIANA HERRERA FUENTES



DIRECCIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. ANNIE PARDO SEMO

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCIÓN 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**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:

"Efecto de la Osteopontina sobre una línea de fibroblastos normal  
y una línea de células epiteliales de pulmón A549"

realizado por HERRERA FUENTES ILIANA con número de cuenta 9324541-2

quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Annie Pardo Semo

Propietario M. en C. Ma. de los Remedios Josefina Ramírez Rangel

Propietario Biol. Jorge Antonio García Alvarez

Suplente Biol. José Gpe. Cisneros Lira

Suplente M.enC. Lilia Carina Becerril Berrocal

**Consejo Departamental de BIOLOGIA**

FACULTAD DE CIENCIAS

M.enC. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGIA

*A los grandes pilares de mi vida*

*Agustín Herrera M. e Irma Fuentes A.*

*Por mi oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional.*

*Por lo que ha sido y será .....*

*¡ GRACIAS !*

*A mis pequeñas traviesas...  
Isy por ser mi apoyo incondicional  
Liz por ser mi ejemplo a seguir  
Nena por ser mi estrella \**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y mis profesores, por la formación heredada durante todos estos años.

A la Dra. Annie por hacerme partícipe de sus conocimientos, por sus consejos y su apoyo para la realización de éste trabajo, es una persona digna de admirar.

Al Dr. Selman, por brindarme la oportunidad de realizar el proyecto de investigación en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

A mis sinodales: Remedios Ramírez y Jorge Álvarez por enseñarme los conocimientos básicos para la realización de esta tesis, a Karina Becerril y José Cisneros por su paciencia, sus conocimientos compartidos y asesoramiento en éste trabajo.

Especialmente a Pepe por ser mi motivo para seguirme superando y por confiarme lo más valioso que tienes.

De igual forma a Víctor Ruíz, Ignacio Páramo, Martha Montaña, Dr. Carlos Ramos, Dra. Carmen Navarro y Rafael Reynoso que en algún momento cuando lo necesité me aconsejaron desinteresadamente.

A mis amigos (as), Alexa, Lis, Andrés, Abraham, Maricela, Maribela, Diana, Elisa, Talina, César A. por compartir tantas cosas durante todos estos años y ser incondicionales. A Ale, Maribel y Juan Carlos por empezar a formar parte de ellos.

A mi mejor amigo Marco Antonio Checa, porque a pesar de los momentos difíciles siempre has estado a mi lado y me brindaste tu confianza; gracias Cori.

A mis tíos (as), primos y a Fanny por motivarme a cada momento.

Por último, y no por eso menos importante, al Sr. Jorge Rosado Durán por su valiosa colaboración.

A él..... RRMG, un triunfo más.

## ÍNDICE

	Pag.
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
Matriz Extracelular.....	3
Moléculas de la Matriz Extracelular.....	4
Degradación de las Moléculas de la Matriz Extracelular.....	8
Familia de las Metaloproteinasas de Matriz.....	8
Dominios Estructurales de las Metaloproteinasas.....	9
Clasificación de las Subfamilias de las Metaloproteinasas.....	12
Regulación de Metaloproteinasas.....	16
Osteopontina.....	19
<b>OBJETIVO</b> .....	24
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	24
Obtención de fibroblastos.....	24
Línea celular epitelial.....	25
Cultivo celular.....	25
Extracción de RNA.....	26
Ensayo de Northern blot.....	27
Transferencia.....	28
Sondas moleculares.....	29
Marcaje con <sup>32</sup> P.....	30
Hibridación.....	30
Densitometría.....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	32
Efecto de la Osteopontina sobre la expresión de MMP-1 en una línea de fibroblastos normales.....	32
Efecto de la Osteopontina sobre la expresión de MMP-7 en una línea epitelial A549.....	35
<b>DISCUSIÓN y CONCLUSIÓN</b> .....	40
<b>REFERENCIAS</b> .....	43

## RESUMEN

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína ácida no colágena de matriz extracelular que es altamente expresada en padecimientos como la fibrosis pulmonar. La OPN posee una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que le permite interactuar con varias integrinas pero además puede interaccionar con otros receptores como CD44. Se le considera una proteína multifuncional que participa en procesos de adhesión celular, migración, proliferación y quimiotaxis de diversos tipos celulares. La OPN puede interactuar con la maquinaria intracelular que podría modular la expresión de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), que son enzimas que degradan a la matriz extracelular y desempeñan un papel clave en procesos que implican la remodelación tisular. Sin embargo, se desconoce si la OPN puede modular la expresión de MMP's en fibroblastos de pulmón y células del epitelio alveolar.

El objetivo de éste trabajo fue analizar el efecto de la OPN sobre la expresión de la colagenasa-1 (MMP-1) en fibroblastos de pulmón humano normal y de la matrilisina (MMP-7) en una línea de células epiteliales A549.

Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos de pulmón y células epiteliales de una línea celular comercial (A549). Los fibroblastos se expusieron a diferentes concentraciones de OPN [0.4µg/ml] y [1µg/ml] durante 24 hrs y entonces se analizó la expresión de MMP-1 por Northern blot. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la OPN en la expresión de MMP-1 en fibroblastos que prácticamente no expresan esta enzima en condiciones basales y que previamente fueron estimulados con Phorbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA) [0.01µg/ml], un inductor de

la transcripción. Por otra parte, las células epiteliales fueron sometidas a concentraciones crecientes de OPN (0.1µg/ml, 0.4µg/ml y 1µg/ml) y después de 24 hrs de estímulo se analizó la expresión génica de MMP-7 por Northern blot. En un experimento adicional se evaluó la expresión de MMP-7 en células A549 que previamente fueron estimuladas con PMA durante 24 hrs y que después se trataron con OPN [0.4 µg/ml] durante 6 y 24 hrs (PMA+OPN).

Se encontró que la OPN disminuye la expresión de la colagenasa (MMP-1) en los fibroblastos en un 50-70% con respecto al control que fue mantenido en medio sin suero. La disminución en la expresión de MMP-1 por OPN fue una respuesta dosis-dependiente. Así mismo, se observó que la OPN también disminuyó en un 50% los niveles de expresión de la MMP-1 en fibroblastos que previamente fueron tratados con PMA. En el caso de las células epiteliales, se observó que el estímulo con OPN incrementa los niveles de expresión de la MMP-7 en 2.2 veces respecto al control que fue mantenido en medio sin suero y en el cual los niveles de expresión de esta enzima fueron muy bajos. En este caso no se observó una respuesta dosis dependiente. Adicionalmente se observó que el estímulo con PMA incrementa la expresión de MMP-7 en estas células, pero interesantemente la OPN tiene un efecto aditivo ya que los niveles de expresión de esta enzima aumentaron en un 50% en las células tratadas con PMA+OPN en comparación con las células que fueron tratadas únicamente con PMA.

Estos resultados sugieren que la osteopontina podría desempeñar un papel profibrosante debido a que esta proteína puede disminuir la producción de colagenasa (MMP-1) en fibroblastos y aumenta la producción de MMP-7 en células epiteliales.

## **INTRODUCCIÓN.**

### ***Matriz Extracelular.***

La matriz extracelular (MEC) comprende al material que se encuentra fuera de las células entre los límites endoteliales y epiteliales en los tejidos de los organismos multicelulares y se considera que desempeña un papel central en el mantenimiento de la integridad estructural de los mismos. La MEC forma parte de una gran variedad de estructuras que van desde ligamentos elásticos, la córnea, el revestimiento transparente del globo ocular, forma diversas membranas como las que están en la base de los epitelios y endotelios, redes reticulares en los órganos, vasos sanguíneos y paredes intestinales, láminas asociadas con los músculos y nervios, membrana alveolo-capilar a través de la cual se realiza el intercambio gaseoso en el pulmón, membrana glomerular por la cual se eliminan productos de desecho en el riñón, el espacio estructural por donde se movilizan nutrientes en la placenta y tracto gastrointestinal. Además puede llegar a calcificarse dando forma a estructuras duras tales como los dientes y huesos. Su presencia en los diferentes órganos es muy variable, así en la piel, cartílago, tendón y hueso es un componente muy abundante, mientras que en el cerebro y la médula espinal es muy escaso. La MEC está conformada por una gran variedad de moléculas las cuales interaccionan entre si generando una estructura tridimensional a la cual las células se adhieren ya sea por receptores específicos o ligandos. Las macromoléculas que constituyen la MEC incluyen entre otras, a la familia de las colágenas que son las responsables de la resistencia mecánica de

los tejidos conjuntivos, la elastina que le confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad, proteínas de adhesión como fibronectinas y lamininas, y los proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad (1).

La matriz, desempeña un papel importante no sólo en la conservación de la integridad estructural de los organismos, si no además desempeña un papel activo y complejo en la regulación de los procesos básicos de las células que tienen contacto con ella. En este sentido la MEC influye en múltiples funciones celulares tales como proliferación, diferenciación, migración, adhesión y apoptosis.

La MEC también funciona como reservorio de factores de crecimiento polipeptídicos; los cuales se pueden clasificar en dos categorías, los que se asocian con el heparán-sulfato extracelular, entre los que destacan los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF por siglas en inglés) y los que se unen a proteínas de la MEC tales como el factor de necrosis tumoral alfa y el factor de crecimiento transformante beta (TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  por sus siglas en inglés).

### ***Moléculas de la Matriz Extracelular.***

#### **Colágenas:**

Las colágenas son las proteínas más abundantes de las matriz extracelular; su nombre proviene del griego *cola*, que significa pegamento, y *genos*, nacimiento. Son consideradas una clase heterogénea de moléculas que forman parte de una super familia derivada de genes altamente relacionados. A través del tiempo se les ha definido como proteínas estructurales de la matriz, ya que presentan una secuencia característica de repeticiones de una unidad de tres aminoácidos Gly-X-Y. Hoy en día se han descrito 18 tipos genéticos de colágenas en vertebrados,

todos sin excepción presentan uno o más dominios colagénicos con una estructura de triple hélice. Si hablamos de las colágenas intersticiales, más del 95% de su estructura es de triple hélice y consiste de tres cadenas polipeptídicas, en las que cada tercer aminoácido lo constituye una glicina siendo éste el más pequeño de los aminoácidos. En cuanto a su estructura repetitiva Gly-X-Y la cual se encuentra en la triple hélice, cerca del 30% de las posiciones X-Y están ocupadas por prolina e hidroxiprolina, respectivamente, proporcionándole rigidez y estabilidad a la molécula. A los diferentes tipos de colágena se les ha asignado un número romano que generalmente refleja el orden cronológico en el que fueron descubiertas, en tanto, sus cadenas polipeptídicas individuales, denominadas alfa, también están numeradas con números arábigos para cada tipo genético de colágena (1).

A continuación se describen los principales tipos de colágenas:

**a) Colágenas fibrilares:** conformada por las colágenas tipo I, II, III, V y XI denominadas colágenas formadoras de fibras. Como se mencionó anteriormente más del 95% de su estructura es de triple hélice y la colágenas tipo I es la proteína más abundante en animales. Algunas de estas colágenas participan, *in vivo*, en la formación de fibras heterotípicas entre las que destacan fibrillas hechas de más de un tipo de colágena (1-3).

**b) Colágenas asociadas a fibras:** conformada por las colágenas tipo IX, XII y XIV. Participan en la formación de fibras junto con las colágenas fibrilares, pero éstas no son capaces de formar agregados supramoleculares y no forman fibras por sí mismas. La estructura de estas moléculas se puede dividir en tres regiones funcionales. Una región comprende uno o dos dominios en triple hélice que sirven

de interacción de estas moléculas a las fibras. Una segunda región comprende otro dominio en triple hélice que constituye un brazo rígido que se proyecta hacia fuera de la fibra y una tercera región que no se encuentra en triple hélice y a través de la cual se establece la interacción con otros elementos de la matriz o con células. Las regiones en triple hélice están separadas por dominios cortos que no tienen la estructura triple helicoidal. Este tipo de colágenas no presentan un procesamiento proteolítico a partir de precursores mayores, es decir, se secretan como se sintetizan (1,3).

c) Colágenas que forman láminas: colágenas que participan en la formación de láminas o membranas proteicas que rodean tejidos u organismos. En el sentido estricto hablando de similitud entre los tipos genéticos que la componen algunos autores han agrupado aquí a las colágenas tipo IV, VIII y X, mientras que otros las dividen en dos clases diferentes, colágenas de membrana basal (tipo IV) y de cadena corta (tipos VIII y X). La colágena tipo IV fue la primera colágena no fibrilar ampliamente estudiada considerada como un componente de las membranas basales, en la cual forma una fina red de cordeles entrelazados que tienen la función de atrapar 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 (1-4).

#### **Elastina:**

La elastina es considerada como una proteína fuertemente hidrofóbica que se sintetiza en forma soluble (tropoelastina) y sufre varias modificaciones pos-

traduccionales. Esta proteína se empaca 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. Estas desempeñan un papel fundamental en la estructura de las matrices intersticiales y en la organización tisular; de ésta forma dependiendo del tejido, por un lado otorgan la flexibilidad apropiada, y por otro, permiten la resistencia a los procesos de estiramiento. Cabe mencionar que estas fibras se encuentran en mayor proporción 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 (6).

#### **Fibronectina:**

Familia de glucoproteínas multifuncionales, se pueden encontrar tanto en forma insoluble, formando parte de la MEC, como en forma soluble circulando en el plasma. Estas moléculas están constituidas por dos subunidades polipeptídicas de 230 y 250 kDa, respectivamente, las cuales se encuentran ligadas por uniones disulfuro. La estructura de la fibronectina está fuertemente conservada en la escala evolutiva y es altamente repetitiva, con tres unidades básicas, denominadas homologías tipos I, II y III, las cuales constituyen el esqueleto de la proteína.

La fibronectina desempeña un papel fisiológico importante no sólo en la formación de la matriz extracelular, sino además en la adhesión y migración celular, en la opsonización y en la cicatrización de las heridas, entre otras. Cabe destacar que esta proteína extracelular actúa como sustrato para la adhesión celular durante la embriogénesis y la organogénesis y su participación en procesos tales como, la

gastrulación, la migración de las células de la cresta neural, la diferenciación de las células hematopoyéticas y el desarrollo cardíaco y pulmonar entre otras (5,7).

### **Laminina:**

La laminina es una glucoproteína filamentosa y es abundante en láminas basales de las matrices extracelulares embrionarias. Presentan una estructura altamente conservada en diferentes especies como en el hombre, ratón, mosca de la fruta, 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 diferentes formas de laminina y en caso de que se presente algún cambio en la composición de sus subunidades, esto puede repercutir no sólo 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 (8).

## **DEGRADACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.**

### ***Familia de las Metaloproteinasas de Matriz.***

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz, la cual se lleva a cabo de una forma puntualmente programada. El desequilibrio en el metabolismo de las moléculas de la MEC se ha asociado con diferentes procesos patológicos como la artritis reumatoide, la cirrosis hepática, el enfisema pulmonar, la fibrosis pulmonar, la aterosclerosis y algunos tipos de cánceres (9).

Existe un cuerpo importante de evidencias que señalan a las metaloproteinasas de matriz (MMP's) como los mediadores fisiológicos de la degradación de matriz extracelular.

El primer reporte que se tiene es el de una enzima de vertebrados capaz de degradar la triple hélice de la colágena fibrilar tipo I. Cuando Gross y Lapiere demostraron que la actividad enzimática que se liberaba de la cola del renacuajo en metamorfosis era una colagenasa verdadera (10).

En la actualidad se sabe que las MMP's constituyen una familia de endopeptidasas ampliamente distribuida a lo largo de la escala evolutiva, incluyendo representantes en invertebrados, bacterias y plantas. En conjunto, estas enzimas pueden degradar todos los componentes de la matriz extracelular y su actividad enzimática además incluye a sustratos diferentes a la MEC, tales como quimiosinas o citosinas, incluso puede actuar sobre inhibidores de proteasas como la  $\alpha$ 2-Macroglobulina (11-14).

### ***Dominios Estructurales de las Metaloproteinasas.***

Esta familia de enzimas comparte un conjunto de dominios que se explican a continuación y se ilustran en la Fig.1 (12,15-19).

- El **pre-dominio** que codifica para un péptido señal que dirige a la proteína a la secreción extracelular.
- Un **dominio propeptídico**, que consta de ~ 80 aa y que presenta la secuencia consenso PRCXXPD, tiene un residuo de cisteína el cual forma un enlace coordinado con el  $Zn^{2+}$  presente en el dominio catalítico,

responsable del enmascaramiento del sitio activo en las proenzimas o zimógenos.

- El **dominio catalítico** de 170 aa aproximadamente es indispensable para la actividad enzimática y contiene el sitio de unión a  $Zn^{2+}$  y a  $Ca^{2+}$ .
- Una **secuencia rica en prolina** que juega el papel de bisagra.
- Un **dominio carboxilo terminal** tipo hemopexina de aproximadamente 120 aa. Este dominio es indispensable para la actividad de triple helicasa y además es de gran importancia en la unión al sustrato y en interacciones con los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP's por sus siglas en inglés). Este dominio está ausente en la matrilisina (MMP-7) y en MMP-27.

Existen otros dominios estructurales que sólo presentan ciertas MMP's y son los siguientes:

- **Dominio tipo furina**, es el sitio que permite la activación intracelular mediante la hidrólisis de un enlace peptídico. Algunas enzimas como las metaloproteinasas de membrana (MT-MMP), la estromelisina -3 (MMP-11), la MMP-13 y CA-MMP/MMP-23 tienen este dominio.
- **Dominio de anclaje transmembranal**, se presenta en el subgrupo de MT-MMPs, las cuales se caracterizan por presentar dos tipos de dominio: GPI y el transmembranal tipo I; CA-MMP/MMP-23 tiene transmembranal tipo II.
- **Dominio tipo fibronectina**, lo presentan el subgrupo de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9).
- **Dominio similar a la colágena tipo V**, está presente sólo en gelatinasa B (MMP-9), la enzima de mayor peso molecular de ésta familia.

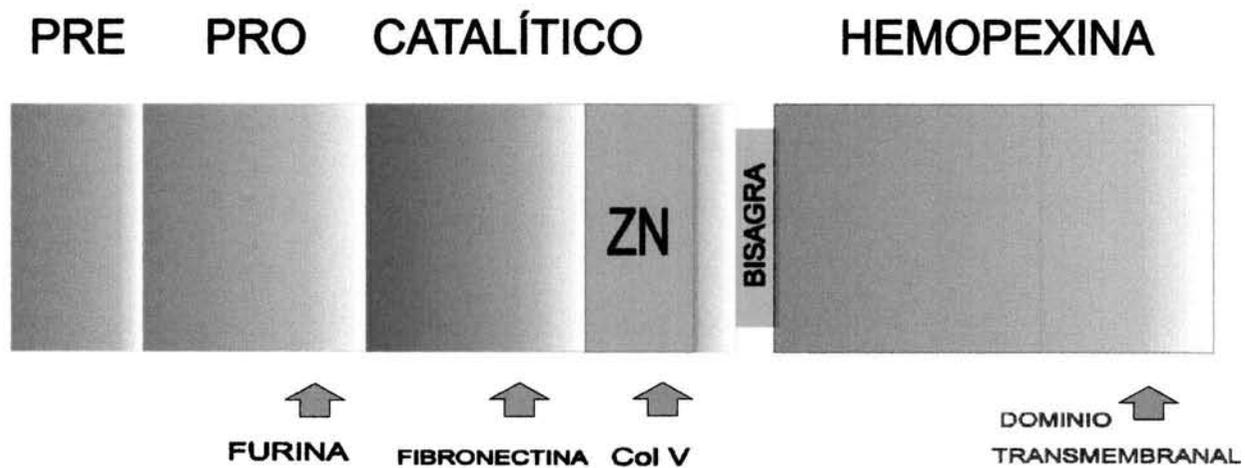


Figura 1. Esquema de los dominios estructurales de las metaloproteinasas

### ***Clasificación de las subfamilias de las MMP's.***

Hasta la fecha se han identificado 23 diferentes MMP's de vertebrados (Tabla 1) y basándose en su similitud estructural y la afinidad por sus sustratos se han clasificado en 6 diferentes subfamilias (20-24).

- **Colagenasas:** esta subfamilia de metaloproteinasas rompe enlaces peptídicos en la región triple helicoidal de las colágenas intersticiales y degrada preferentemente colágenas fibrilares tipos I, II y III. En humanos este grupo reúne a 3 distintos miembros: la colagenasa-1 (MMP-1), conocida también como colagenasa intersticial, la cual es expresada principalmente por fibroblastos, macrófagos y células epiteliales; la colagenasa-2 (MMP-8) que la expresan fundamentalmente los neutrófilos y la colagenasa-3 (MMP-13) clonada de un carcinoma humano mamario.
- **Gelatinasas:** degradan principalmente la colágena tipo IV encontrada en membranas basales, fibronectina y elastina; su nombre es gracias a su capacidad para degradar gelatina o también conocida como colágena desnaturalizada y a la fecha se han caracterizado dos miembros de este subgrupo, la gelatinasa A (colagenasa tipo IV de 72 kDa/MMP-2) y la gelatinasa B (colagenasa tipo IV de 92 kDa/MMP-9).
- **Matrilisinas:** esta subfamilia ha perdido el dominio carboxilo terminal, lo cual significa que reúne a proteasas con sólo los tres dominios necesarios

para la secreción, latencia y actividad catalítica. Presentan una amplia afinidad por sustratos; entre los que se encuentran la fibronectina y está representado por la matrilisina (MMP-7) y la matrilisina-2 (MMP-26).

- **Estromelisinás:** son enzimas que presentan afinidad por sustratos variados, dentro de los cuales están la parte proteica de los proteoglicanos, la fibronectina y laminina. Varias enzimas se han clasificado tentativamente en este grupo, como las estromelisinás 1 (MMP-3), 2 (MMP-10) y 3 (MMP-11).
- **MMP's tipo membrana (MT-MMP):** son proteínas que dentro de sus características están el anclaje a membrana, tienen un dominio transmembranal y una pequeña cola citoplásmica. También poseen un dominio de furina sitio por el cual se da el reconocimiento para su activación intracelular. A ésta subfamilia la componen 6 miembros diferentes MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP y MT6-MMP son capaces de activar otras MMP's como la MMP-2, y MMP-13, las cuales pueden degradar numerosas proteínas de la MEC como fibronectina, laminina, colágena, gelatina, entre otras; incluso *in vitro* pueden activar algunas citosinas.
- **Otras MMP's:** dentro de éstas se encuentran un grupo de enzimas cuyas propiedades estructurales o funcionales no les permite ser clasificadas en

los subgrupos mencionados, de las cuales se encuentran la metaloelastasa de macrófagos MMP-12, la MMP-19 , la MMP-20, la MMP-23, la MMP-27 y la MMP-28.

**Tabla 1**

<b>Subfamilia</b>	<b>MMP</b>	<b>Nombre común</b>
Colagenasas	MMP-1 MMP-8 MMP-13 MMP-18*	Colagenasa -1 (colagenasa intersticial.) Colagenasa -2 (colagenasa de neutrófilos.) Colagenasa -3 Colagenasa -4
Gelatinasas	MMP-2 MMP-9	Gelatinasa A (colagenasa de 72 kDa tipo IV). Gelatinasa B (colagenasa de 92 kDa tipo IV).
Matrilisinas	MMP-7 MMP-26	Matrilisina 1 o PUMP1 Endometasa o matrilisina-2
Estromelisinias	MMP-3 MMP-10 MMP-11	Estromelisinina-1 (transina-1) Estromelisinina-2 (transina-2) Estromelisinina-3
MMP's tipo membrana	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP MT5-MMP MT6-MMP (Leucolisina)
Otras	MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-23 MMP-27 MMP-28	Metaloelastasa de macrófagos RASI-1 Enamelisina. CA-MMP Epilisina

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

### **Regulación de MMP's.**

La regulación de estas enzimas comprende varios niveles entre los que se incluye: la expresión del gen, la activación del zimógeno y la inhibición enzimática por TIMP's.

La regulación de la expresión génica es llevada a cabo por una variedad de citosinas, como factores de crecimiento y mediadores inflamatorios los cuales pueden incrementar o disminuir la expresión de la enzima en una célula específica. Moléculas como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento epidermal (EGF) y la interleucina-1 (IL-1), son capaces de aumentar la expresión de algunas MMP's a través de una combinación de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales (24,25).

En cuanto a la activación del zimógeno; éstas se regulan por medio de la digestión parcial del dominio propeptídico. Salvo en algunos casos, como en las procollagenasas de fibroblastos, neutrófilos y las pro-estromelinas 1 y 2, los propéptidos presentan zonas de rompimiento para enzimas como la plasmina y la tripsina las cuales provocan un rompimiento que desestabiliza la interacción entre un residuo de Cys y el  $Zn^{2+}$  por lo que la conformación de la proteína cambia, permitiendo así el proceso autocatalítico hacia la forma activa. Hasta la fecha los activadores fisiológicos de muchas de éstas enzimas no se conoce con precisión por lo que se ha sugerido la existencia de una cascada en la que algunos de los miembros de la familia de las MMP's tienen la capacidad de activar a otros miembros de la misma familia. Considerando de especial interés a la progelatinasa A (MMP-2), la cual difiere en su activación llevándose a cabo en la superficie celular. siendo que las metaloproteinasas de membrana desempeñan un papel

central mediante un complejo mecanismo que involucra a la MT1-MMP y al TIMP-2 (13,25,26).

Finalizando con la regulación por inhibición; la actividad de las MMP's puede ser modulada a través de interacciones con inhibidores tisulares de metaloproteinasas conocidos como TIMP's (del inglés Tissue Inhibitor of Metallo Proteinase: TIMP), los cuales se unen a las MMP's en el sitio de unión al Zinc. La familia de los TIMP's consta de cuatro miembros: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4; los cuales se encargan del control de la actividad de las metaloproteinasas y por consiguiente del balance entre la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular. Además de su actividad inhibitoria sobre las MMPs, los TIMPs pueden desempeñar otras funciones y en este sentido pueden modular la proliferación, son promotores del crecimiento celular, inhibidores de la angiogénesis y pueden inducir la apoptosis. Contienen regiones únicas que distinguen a cada miembro por lo que existen diferencias en su afinidad por las MMP's (13,24,27).

### ***MMP-1***

La expresión génica de la colagenasa-1 o MMP-1, se puede regular por una variedad de agentes tales como citosinas y promotores de tumores, por la vía de factores de transcripción c-fos y c-jun. Estas dos proteínas al interactuar con los sitios de unión del activador de proteína-1 (AP-1), también conocido como 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TAP), propicia un incremento en la transcripción de éste gen (28). Moléculas como la interleucina-13 (IL-13) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) pueden inhibir la síntesis de la MMP-1. TGF- $\beta$  es

considerado como el más importante en procesos fibrosantes, ya que se ha reportado que este factor incrementa de la síntesis de colágena en fibroblastos y análogamente de su inhibidor endógeno el TIMP-1, por el contrario provoca una disminución degradativa de la colágena ya que inhibe la expresión de MMP-1(20). Por otra parte existen otras moléculas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor ácido de crecimiento para fibroblastos (FGF-1) que pueden incrementar la síntesis de esta enzima (29).

Estudios llevados a cabo en artritis reumatoide han demostrado que la osteopontina puede estimular la producción de MMP-1 en fibroblastos y condrocitos articulares, lo cual podría contribuir a la degradación de matriz extracelular, facilitando el proceso invasivo de tejido sinovial en esta enfermedad (30).

### ***MMP-7***

La MMP-7 tiene un peso aproximado de 28 KDa, se expresa constitutivamente en el epitelio de glándulas peribronquiales, células epiteliales y es producida de una forma regulada por monocitos de sangre y macrófagos en tejidos. En pulmones de pacientes con fibrosis cística (FC), es producida por células alveolares tipo II, por lo que la MMP-7 es sobre-regulada en respuesta al daño quizá para facilitar la migración celular epitelial siendo que es la MMP más predominante al controlar la reparación del epitelio del pulmón. Es estimulada en monocitos por lipopolisacáridos, los cuales se encuentran en altas concentraciones en FC pudiendo modular la expresión de proteinasas por células residentes de pulmón, la cual, puede presentarse en respuesta a una obstrucción crónica. Sólo algunas citosinas han sido estudiadas en la expresión de la matrilisina. Alternativamente,

la matrilisina puede tener un papel aberrante en la FC y contribuir de alguna forma al daño de la pared celular y de hecho, se ha observado que el daño en los epitelios alveolares se acompaña de una sobreexpresión de MMP-7 en los neumocitos tipo II, lo cual sugiere que su actividad proteolítica puede ser de gran importancia para facilitar la reparación y migración celular (31).

También se ha reportado que la MMP-7 desempeña un papel importante en la fibrosis pulmonar (FP) desarrollada en ratones y humanos. En este sentido, se ha publicado que la instilación de bleomicina en ratones knockouts para la MMP-7 produce menos lesiones fibróticas respecto a los ratones que si tienen el gen de esta enzima (MMP-7<sup>+/+</sup>), por lo que se ha postulado como una posible proteína que podría desempeñar un importante papel en la intervención terapéutica de la fibrosis pulmonar y se ha demostrado que la MMP-7 puede actuar por la vía del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y Fas (32).

### ***Osteopontina.***

La osteopontina (OPN) es una proteína no colagénica de la MEC que se caracteriza por ser una fosfoproteína glicosilada rica en aspartato, glutamato y serina, que contiene cerca de 30 monosacáridos, incluyendo 10 ácidos siálicos. Tiene un peso molecular de aproximadamente 32.5 kDa y se fosforila posiblemente en más de 28 sitios. Presenta una secuencia señal amino-terminal, una región ácida constituida por 9 residuos consecutivos de ácido aspártico y una secuencia GRGDS de adhesión celular que se ha predicho que flanquea la estructura de la hoja  $\beta$ -plegada y una secuencia carboxilo-terminal por el cual se puede unir al receptor CD44 (33).

La OPN es una proteína multifuncional, que actúa como proteína de la MEC y como una citosina proinflamatoria (34). Se une a otras proteínas de la matriz extracelular como son la colágena tipo I, la fibronectina y la osteocalcina y se ha descrito que se une a varias integrinas de la superficie celular a través del motivo RGD (35), mientras que la unión al receptor CD44 ocurre a través de un dominio diferente al RGD (36). El receptor CD44 tiene una estructura compleja con 10 exones variantes que pueden ser empalmados dentro del dominio extracelular, el cual es fisiológicamente más abundante en varias células del sistema inmune y también expresado en múltiples tejidos, pero en mayor cantidad en células epiteliales y fibroblastos. La OPN interactúa con varias integrinas incluyendo la  $\alpha 9\beta 1$  y la  $\alpha 4\beta 1$  que se expresan en células epiteliales, células del músculo liso, células de médula ósea y neutrófilos. La subunidad  $\beta 1$  posee una secuencia amino-terminal SVVYGLR, lo cual permite que esta integrina se asocie con el receptor CD44 en la membrana celular y de este modo puede servir como un receptor para la OPN (37).

La OPN ha sido reportada como una citosina esencial para la diseminación de varios cánceres, gracias al estudio de dos estrategias que evitan la expresión del gen en el nivel de RNAm, es decir, por medio de ribozimas o por hibridación con oligonucleótidos antisense. En ambos casos, el RNAm es degradado antes de que este pueda ser traducido dentro de la proteína. Esta molécula puede ser inhibida con anticuerpos o péptidos sintéticos y su receptor (CD44) ha sido el blanco para diversas estrategias terapéuticas (38).

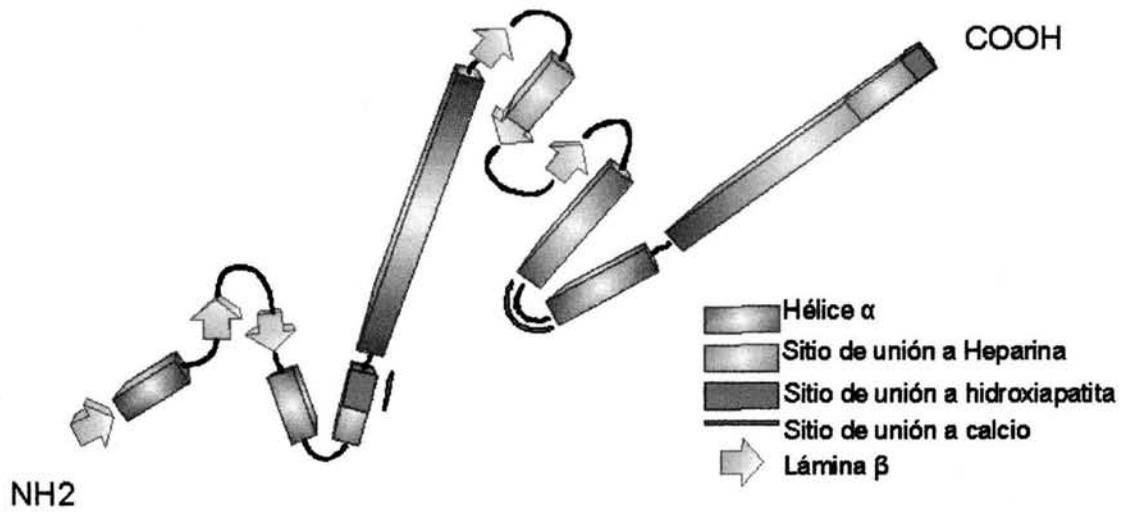
Las interacciones de la OPN a través de los diferentes receptores median caminos de señalización importantes, por ejemplo, se ha demostrado que interactúa con el receptor de globulina CD44, participando en funciones tales como adhesión celular, migración e invasión a MEC. Además induce proliferación celular en varios tipos celulares a través de la interacción con el receptor de la integrina  $\alpha\beta 3$  (39-41). Por otro lado, la OPN puede funcionar como una citocina quimiotáctica, que regula la respuesta inmune celular promoviendo la adhesión, migración, y activación de macrófagos (40,42). La OPN es producida por osteoclastos, macrófagos, células T y células de músculo liso, que contribuyen a la inmunidad celular y a la activación de macrófagos, mediando de alguna forma la neovascularización e inhibición de la apoptosis (40,43).

La OPN presenta un sitio de corte para la trombina y se considera que es un sustrato de la transglutaminasa de tejidos. En estudios previos se ha podido determinar que los mismos receptores que interactúan con OPN pueden modular la interacción de las MMP's que activan a ésta molécula en células provenientes de tumores. De tal modo, que la OPN encontrada en los sitios de tejido dañado puede ser regulada por la actividad de proteasas incluyendo MMP's y que los cambios que se presentan en la bioactividad de OPN, se puede explicar gracias a las diferencias que se presentan tanto en la afinidad de las integrinas como en los distintos eventos de señalización "cascada abajo". Existen reportes de que la MMP-7 y la MMP-3 pueden degradar a la OPN (44), de hecho se ha observado que en algunos procesos en donde ocurre la remodelación de tejidos, como es el caso del útero de rata, en el post-parto, la MMP-7 y la OPN se encuentran

altamente expresadas. Adicionalmente, se reportó que la MMP-3 y OPN se expresan temporalmente durante la tumorigénesis de la piel (38).

Se ha reportado que el factor de crecimiento epidermal (EGF) es un inductor de la expresión del gen de OPN y esta inducción se realiza por la vía de transducción de señales de las proteínas cinasas C (PKC), como una respuesta temprana en fibroblastos, osteoblastos, células del músculo liso y células tumorales. Adicionalmente, la OPN es inducida por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato ya que la región promotora del gen de OPN contiene la región TGACTCA en una orientación invertida para el sitio de iniciación de la transcripción.

La OPN es una citocina fibrogénica, que promueve la adhesión y quimiotaxis de diferentes tipos celulares tales como, células del músculo liso, macrófagos y fibroblastos, gracias a la interacción que presenta con la integrina  $\alpha V$  ( $\beta 3$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 5$ ). Estos hallazgos sugieren que la OPN podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de la fibrosis pulmonar. Dicha enfermedad se caracteriza por la migración, adhesión y proliferación de fibroblastos, en la cual, la activación de éstos es inducida por varias citocinas tales como: Factor de Crecimiento Tumoral-beta (TGF- $\beta$ ), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Estas moléculas son generadas por células inflamatorias incluyendo a los macrófagos alveolares y eosinófilos, los cuales se acumulan en el área fibrótica del pulmón y se ha reportado que los macrófagos de ratas instiladas con bleomicina pueden secretar OPN (45,46).



**Fig. 2 Esquema de la estructura molecular de la osteopontina**

## **OBJETIVO**

Analizar el efecto de la osteopontina sobre la expresión de MMP-1, en fibroblastos de pulmón humano y MMP-7 en una línea celular epitelial A549.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### ***Obtención de fibroblastos.***

Se utilizaron fibroblastos de pulmón obtenidos a partir de biopsias de pacientes, a los que se les realizó una lobectomía para extraer tumores pulmonares primarios. El fragmento pulmonar que se utilizó para la obtención de fibroblastos fue tomado de tejido sin datos morfológicos de enfermedad y considerado como "normal". Los fibroblastos se aislaron por tratamiento enzimático con tripsina-EDTA (Tripsina-EDTA [1X] 0.5grs. de tripsina porcina y 0.2 grs. EDTA, SIGMA) (47) y se incubaron a 37°C por 20 minutos. Posteriormente, las células se establecieron en cajas de cultivo COSTAR T-25cm<sup>2</sup> con medio nutriente de Ham F-12 (Gibco, BRL) enriquecido con suero fetal bovino (Gibco BRL) al 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100µg/ml) y anfotericina B (0.25 µg/ml). Los experimentos que se llevaron a cabo, se realizaron en los pasajes 15 -17.

### ***Línea celular epitelial A549.***

Se usó la línea epitelial A549, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, Md); las cuales son células cancerígenas de pulmón humano. Esta línea es usada por primera vez en 1972 por D.J. Giard y colaboradores, extrayéndola de cultivos de explante de pulmón de tejido carcinomatoso de una hembra Caucásiana de 58 años de edad (48). Estas células al ser examinadas por microscopía electrónica, se observó que presentaban cuerpos de inclusión multilamelar citoplásmico, típico de las células epiteliales alveolares tipo II y son positivas para queratina por tinción con peroxidasa (49).

### ***Cultivo de células.***

Los fibroblastos de pulmón humano N-12 y las células epiteliales (A549) se crecieron hasta llegar a confluencia temprana (80-90%), en cajas T-25 con medio nutriente Ham F-12 (Gibco, BRL), suplementado con 10% de suero fetal bovino y posteriormente se cambiaron a medio libre de suero por 24 h (control), una vez sincronizadas las células se les adicionó 0.01µg/ml de Phorbol 12-Myristato 13-acetato (PMA), concentraciones crecientes de Osteopontina (CALBIOCHEM, Osteopontina, His-tag, Recombinante de ratón): [0.1µg/ml] [0.4µg/ml] y [1µg/ml] y FGF-1+H [20ng/ml] como control positivo. Adicionalmente se utilizó una caja de cultivo de fibroblastos y de células A-549 a las cuales se añadió PMA por 24hrs seguido de OPN [0.4µg/ml] por otras 24hrs.

### ***Extracción de RNA total.***

Para extraer el RNA total de las células, se utilizó el reactivo de TRIZOL (Life Technologies). Dicho reactivo consta de una solución monofásica de fenol y de isotiocinato de guanidina que se basa en el método de Chomczynski y Sacchi (50). Las células se lisaron directamente del cultivo, para lo cual se le adicionó 1ml de TRIZOL por cada 10cm<sup>2</sup> de área, pipeteando el lisado varias veces. Las células homogenizadas se incubaron por 5 min. a temperatura ambiente, permitiendo así la disociación completa del complejo nucleoproteico. Posteriormente se adicionó 0.2 ml. de cloroformo por 1 ml. de TRIZOL, las muestras fueron agitadas vigorosamente durante 15 seg. y se incubaron una vez más a temperatura ambiente por 3 min. Después se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min a 4°C. Se formaron dos fases, la inferior (fenol-cloroformo) de color rojo y la superior incolora acuosa que contenía el RNA.

La fase acuosa fue transferida sin mezclarla con la fase inferior a un tubo nuevo, las muestras fueron precipitadas con 0.5 ml de isopropanol por 1ml de TRIZOL y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 12000 x g a 4°C por 10 min. El sobrenadante fue desechado por inversión y los tubos fueron colocados sobre papel secante. El botón (RNA) que se obtuvo se lavó con 1ml de etanol al 75% por 1ml de TRIZOL, la muestra se mezcló por vórtex y se centrifugó a 7500 x g durante 5 min. a 4°C. Por último, el sobrenadante se desechó una vez más por inversión y los tubos se colocaron sobre papel secante, una vez seco, el botón de RNA, se resuspendió ligeramente por pipeteo en agua libre de RNAsas (15-20µl) y se almacenó a -70°C.

Para determinar la cantidad y pureza del RNA extraído, se tomó 1µl de la solución de RNA total en 750 ml de agua libre de RNAsas y se determino la absorbancia a 260/280 λ en un espectrofotómetro (Perkin Elmer MBA 2000). Se considera que un buen grado de pureza tiene una relación de 260/280 de 1.7 a 2.0 y que 1U de D.O. a 260 nm equivale a 40µg de RNA.

### ***Ensayo de Northern Blot.***

El RNA se separó en geles desnaturalizantes de acuerdo al procedimiento descrito por Thomas (51).

- 1) Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer MOPS (ácido 3 N-morfolino propanosulfónico) de la siguiente manera: 1g de agarosa se disolvió en 75 ml de agua DEPC y se colocó en un horno de microondas por 3 min se le adicionó 8.3 ml de MOPS 12 X (MOPS 0.24 M, acetato de sodio 0.06 M, EDTA disódico 0.012 M) y 16.25 ml de formaldehído al 37%, además de 15 µl de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml, ésta solución se colocó en el molde del aparato para electroforesis.
- 2) Muestras de 30µg de RNA disueltas en 23µl de solución desnaturalizante (formamida 50%, MOPS 1X, formaldehído 6%) se desnaturalizaron por calentamiento a 65°C 15 min. Posteriormente se les agregó 3µl de solución de carga (azul de bromofenol 0.25%, xileno-cianol 0.25% y glicerol 40%) y las muestras migraron por 16-18 hrs. a 15V.
- 3) Una vez finalizada la electroforesis, el gel se retiró del molde y se enjuagó varias veces con agua desionizada estéril, equilibrándolo con SSC 10X

(cloruro de sodio 1.5 M y citrato de sodio 0.15 M) durante 15 min a temperatura ambiente.

### ***Transferencia.***

El RNA desnaturalizado se transfirió a membranas de nylon de acuerdo al procedimiento descrito por Southern (52).

- 1) El sistema de transferencia se realizó por capilaridad, colocándose sobre una placa de vidrio de 26 x 12 cm, 2 hojas de papel filtro Whatman de 3mm previamente humedecidas en SSC 10X. El gel fue colocado de espaldas sobre el soporte sólido. Enseguida se colocó la membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  (Nytran, Schleicher & Schuell) de 11.8 x 14 cm previamente humedecida en SSC 2X. Las burbujas que posiblemente se quedaron entre el papel filtro y el gel, se eliminaron con la ayuda de una varilla.
- 2) Por encima de la membrana de nylon se colocaron de 3-5 hojas de papel filtro Whatman humedecidas en SSC 2X y  $\pm$  10 cm de papel absorbente. Por último se puso una placa de vidrio y un objeto de unos 300-500g de peso, para facilitar el contacto entre los diversos elementos y nivelando éste para que la transferencia se llevara a cabo uniformemente. La transferencia se llevó a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente.
- 3) Al día siguiente se retiraron los papeles absorbentes, la membrana se enjuagó en SSC 2X, se colocó entre dos hojas de papel filtro y se puso a 80°C por dos horas.

- 4) La membrana se observó en un transluminador de UV de onda corta de 300nm (Hoeffer Scientific Instrumental), se marcó el RNA ribosomal (18S) y se obtuvieron fotografías del mismo.

***Sondas moleculares utilizadas para la hibridación.***

**1) Colagenasa intersticial humana (MMP-1).** La clona pC11asel contiene el inserto de colagenasa humana inducido por TPA que tiene un tamaño de 2.054 kb proveniente de la clona total de 5.1 kb. El inserto se encuentra en el plásmido pSP64 resistente a ampicilina y se recupera con las enzimas de restricción Hind III y Sma I. El tamaño del transcrito es de 2.2 a 2.5 kb.

**2) Matrilisina humana (MMP-7).** Nombre del plásmido p67pump, tiene un tamaño de 4.1 kb, el inserto tiene 1.1 kb clonado en el sitio Eco del vector pGEM 7(Z) el cual tiene un tamaño de 3.0 kb. Se lineariza con Xho que corta en el 377 y en el polilinker, así quedará un fragmento de 723 unido a 3 kb del vector. El tamaño del transcrito es de 1.1 kb.

**3) RNA ribosomal, 18S.** Clonado de hipocampo humano, nombre de la clona HHCSA65, tiene un tamaño total de 4.5 kb y el inserto es de 1.5 kb. Tipo de DNA, es un cDNA. El tamaño del transcrito es de 1.8–2.0 kb.

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

### ***Marcaje de las sondas con radiactividad.***

Para llevar a cabo el Northern Blot se utilizaron las sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$ -dCTP, de acuerdo a la técnica de "Random Primer" descrita por Feinberg Volgeistent (53) y bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (Gibco BRL), empleando un kit de marcaje comercial (Prime-It RmT Random Primer, STRATAGENE). Se adicionó en un tubo eppendorf de 1.5ml la concentración suficiente de DNA a marcar (25-50 ng) aforando a un volumen de 42  $\mu\text{l}$  con agua desionizada estéril, el DNA se desnaturalizó en un baño de agua a ebullición durante 5 min. Posteriormente se colocó en hielo inmediatamente y se centrifugó en la nanofuga para coleccionar así la condensación. Se adicionaron 5  $\mu\text{l}$  de los nucleótidos marcados ( $^{32}\text{P}$ -dCTP) y enseguida 3  $\mu\text{l}$  de la polimerasa magenta (4U/ $\mu\text{l}$ ), se homogenizó perfectamente y se incubó a 37°C por 10 min centrifugando nuevamente en la nanofuga para recuperar el condensado. Por último se adicionaron 2  $\mu\text{l}$  de solución stop mix y una vez teniendo la sonda marcada se añadió a los tubos que contenían la solución de hibridación.

### ***Hibridación.***

- 1) Las membranas se colocaron en tubos Schott Glass Max y se prehibridaron con 20 ml de buffer de prehibridación que contenía formamida 50%, SSC 6X, SDS 0.5%, solución Denhard's 5X, DNA de esperma de salmón 100 mg/ml y agua desionizada estéril. Los tubos se colocaron en un Hybaid MAXI 14 a 42°C por 18 hrs.

- 2) Al día siguiente el buffer de prehibridación se eliminó y se les añadió el de hibridación, el cual contenía la sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  dCTP (con  $20 \times 10^6$  cpm por blot). El buffer de hibridación se preparó con formamida 50%, SSC 6X, SDS 0.5%, DNA de esperma de salmón 100 mg/ml y agua desionizada estéril. A ésta solución se le agregó la sonda marcada con  $^{32}\text{P}$ dCTP y se desnaturalizó por 5 min a  $100^\circ\text{C}$ .
- 3) Las membranas se hibridaron por 16-20 h a  $42^\circ\text{C}$ . Al día siguiente se lavaron: 5 min con SSC 2X/SDS 0.1% a  $42^\circ\text{C}$ , 25 min con SSC 2X/SDS 0.1% a  $42^\circ\text{C}$ , 15 min con SSC 0.25X/SDS 0.1% a  $55^\circ\text{C}$  y finalmente dos veces de 15 min c/u con SSC 0.1/SDS 0.1% a  $65^\circ\text{C}$ .
- 4) Posterior a los lavados, las membranas se enjuagaron con SSC 2X, se secaron sobre papel filtro Whatman 3 mm, se envolvieron en papel "kleen pack" y se colocaron dentro del cassette para placas radiográficas. En el cuarto oscuro se colocó la película de rayos X BIOMAX MS de Kodak y se mantuvo a  $-70^\circ\text{C}$  por 48-72 hrs.

### ***Densitometría.***

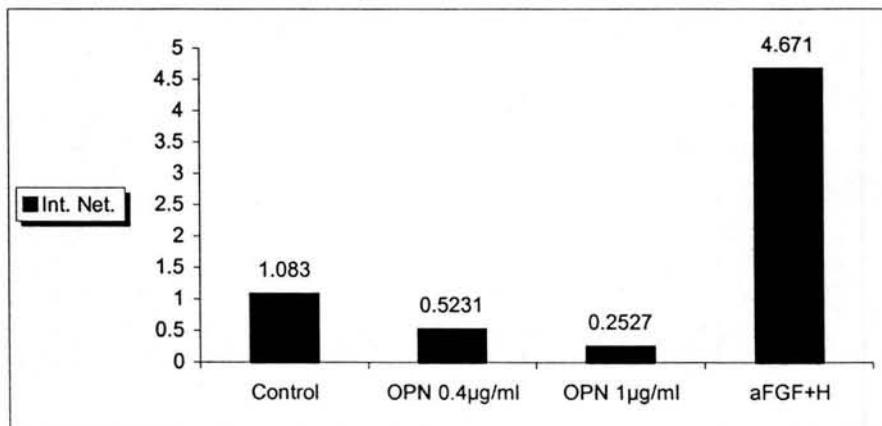
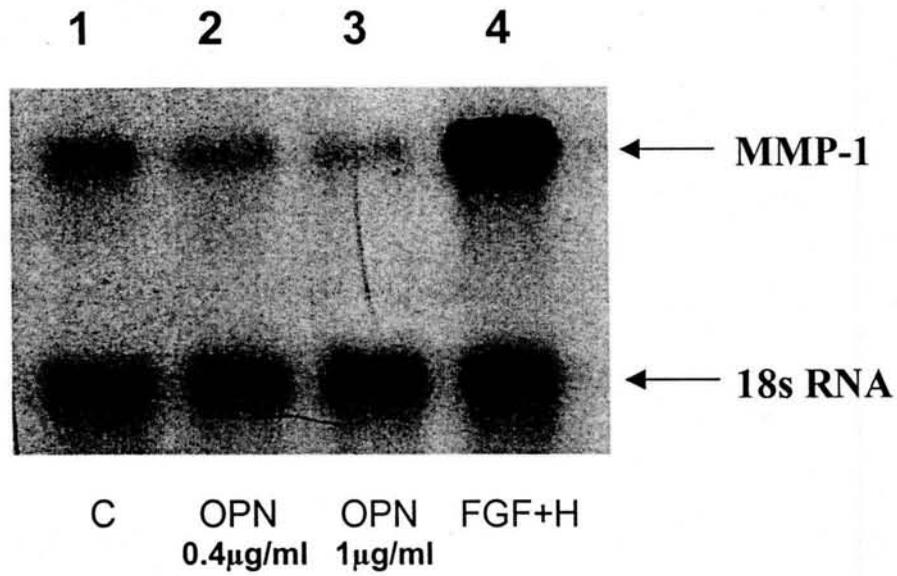
Para hacer un análisis cuantitativo de la expresión de la MMP-1 y la MMP-7, los films correspondientes a cada uno de los Northern se digitalizaron con una cámara Kodak DS160 y se llevó a cabo la densitometría de las bandas obtenidas con el programa Kodak Digital Science 1D. Para determinar las diferencias en los niveles de expresión de estas enzimas entre los controles y los grupos experimentales, el resultado de la intensidad neta correspondiente a las bandas del RNAm de MMP-7 y MMP-1 se dividió entre el valor de intensidad neta correspondiente a la señal del RNAr 18S.

## RESULTADOS.

### *Efecto de la OPN sobre la expresión de MMP-1 en una línea de fibroblastos normales.*

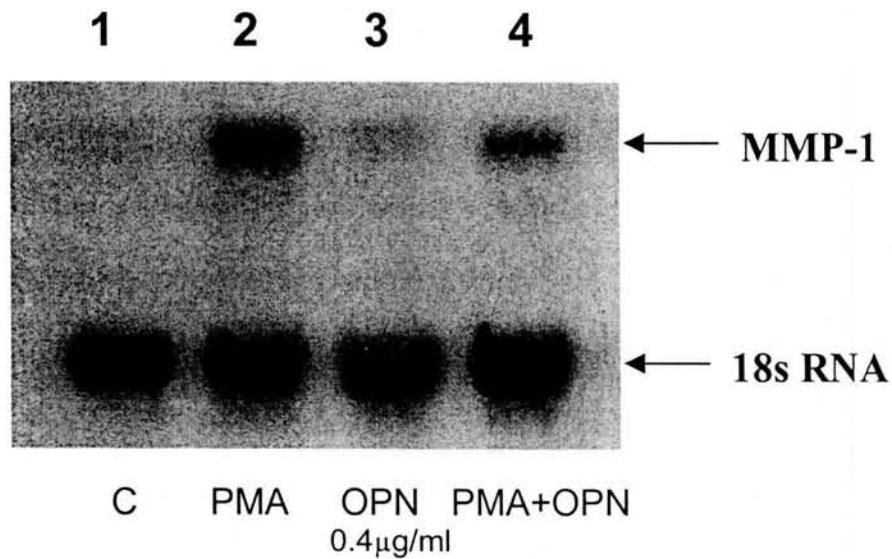
El efecto de la OPN sobre la expresión de la MMP-1 en fibroblastos se examinó por análisis de Northern blot. Como puede observarse en la figura 3, los fibroblastos que fueron incubados en medio libre de suero expresan el transcrito de MMP-1 (carril 1). Cuando estas células se incubaron en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos-1 más Heparina (FGF-1+H) se indujo un incremento en la expresión de MMP-1 (carril 4) como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio (47). En contraste los fibroblastos estimulados con osteopontina a diferentes concentraciones mostraron una disminución en la expresión del transcrito de MMP-1 (carriles 2 y 3).

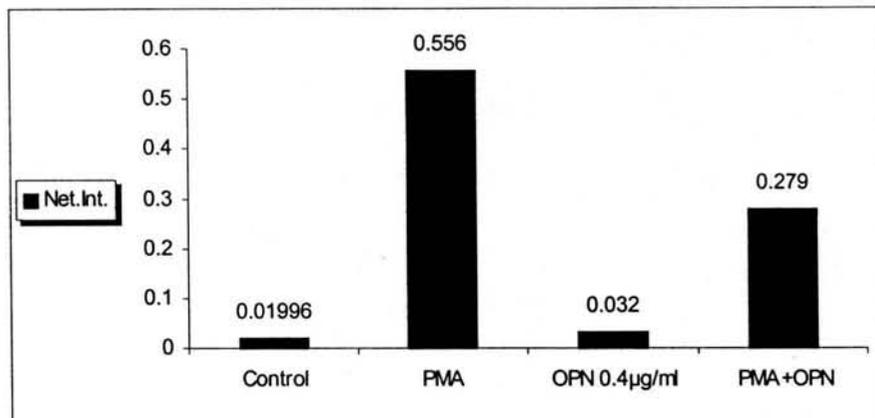
El análisis densitométrico de este experimento mostró que el tratamiento con osteopontina reduce la expresión de MMP-1 en aproximadamente 50% cuando se utilizó una concentración de 0.4 µg/ml. La disminución en la expresión de esta enzima fue más evidente cuando los fibroblastos se estimularon con una concentración de 1 µg/ml de OPN, ya que en este caso se redujo aproximadamente un 70% respecto al control que únicamente fue incubado en medio sin suero. Por el contrario, la expresión de MMP-1 se incrementó en aproximadamente 400% en los fibroblastos que fueron estimulados con FGF-1+H respecto al grupo control.



**Figura 3.** Efecto de la OPN y el FGF-1+H sobre la expresión de la MMP-1 en fibroblastos.

En un experimento adicional se analizó el efecto de la OPN [0.4 µg/ml] sobre la expresión de MMP-1 en fibroblastos que prácticamente no expresan el transcrito de esta enzima en condiciones basales. Como se muestra en la figura 4, cuando las células fueron estimuladas solo con OPN, la expresión de MMP-1 resulto ser muy similar a los niveles del grupo control. Por el contrario, el estímulo con PMA indujo un incremento de 27 veces en los niveles de expresión MMP-1 respecto al grupo control. Interessantemente, la adición de OPN disminuye en un 50% los niveles de expresión de la colagenasa-1 en fibroblastos que previamente fueron estimulados con PMA.



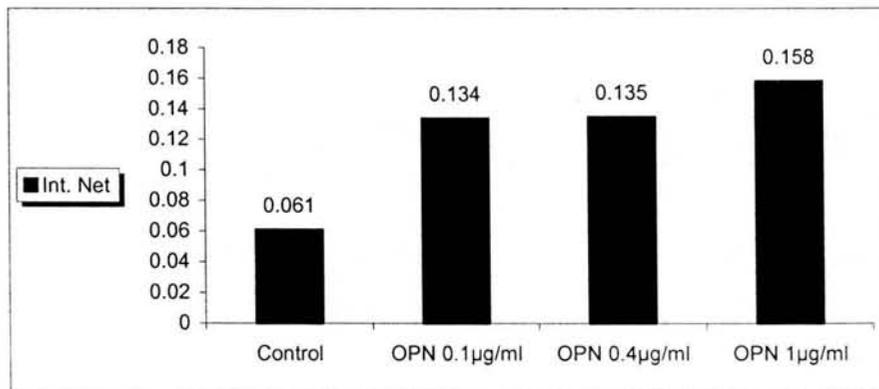
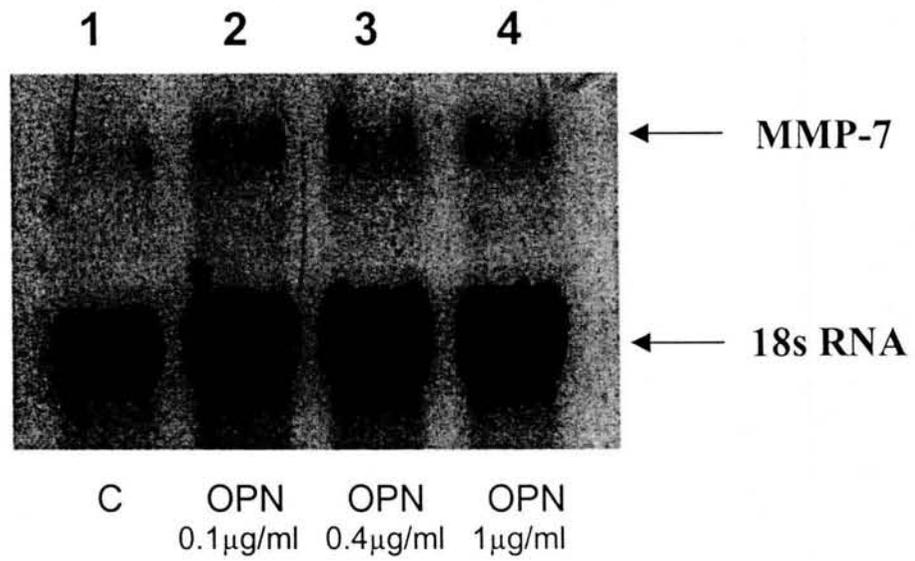


**Figura 4.** Efecto de la Osteopontina (OPN) y Forbol Miristato Acetato (PMA) sobre la expresión de la MMP-1 en fibroblastos.

***Efecto de la OPN sobre la expresión de MMP-7 en células epiteliales A549.***

El efecto de la OPN sobre la expresión de MMP-7 en células epiteliales también se examinó por Northern blot. En éste caso como se puede observar en la figura 5, las células epiteliales A549 que fueron incubadas en medio libre de suero presentaron una mínima expresión del transcrito de MMP-7 (carril 1). Por su parte, las células que fueron tratadas con concentraciones crecientes de OPN (0.1, 0.4 y 1 µg/ml) mostraron un incremento en la expresión de MMP-7, aunque en este caso no se observó un comportamiento dosis respuesta y de hecho el resultado que se obtuvo fue muy similar con las tres concentraciones de OPN utilizadas (carriles 2, 3 y 4).

El resultado del análisis densitométrico de este ensayo reveló que la respuesta de las células epiteliales al estímulo OPN en diferentes concentraciones incrementó 2.2 veces la expresión de MMP-7 respecto al control.

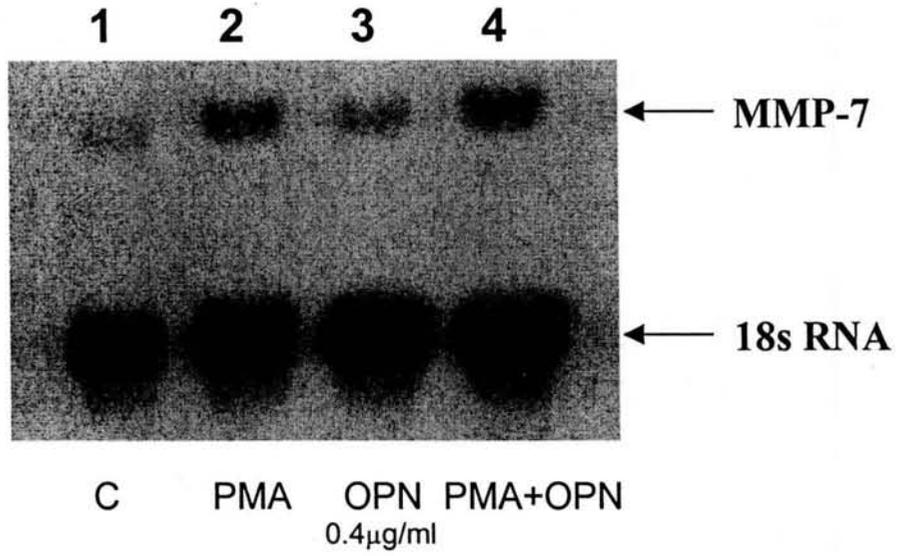


**Figura 5.** Efecto de la OPN sobre la expresión de la MMP-7 en células epiteliales A549.

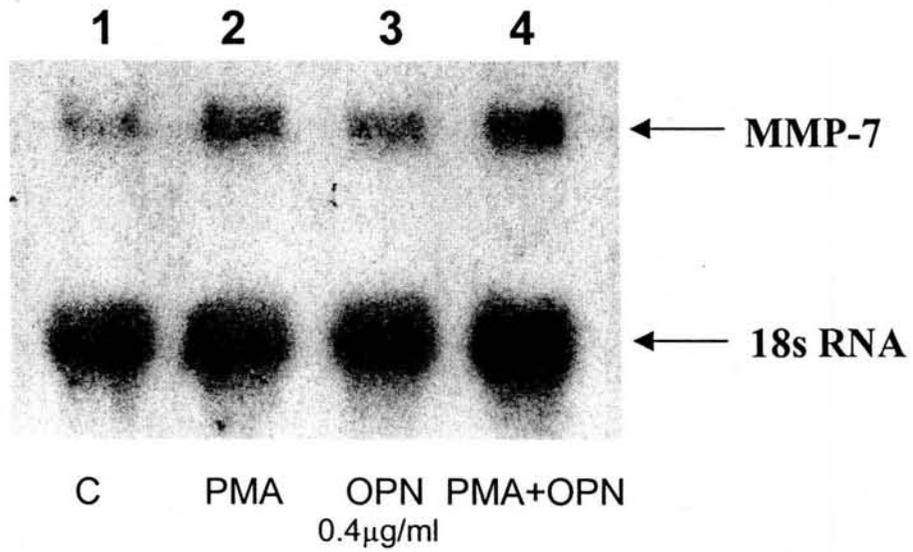
En un experimento adicional, células epiteliales A549 fueron estimuladas con OPN [0.4 µg/ml] y se llevó a cabo el análisis de la expresión de MMP-7 a 6 y 24 hrs. (figuras 6 A y B, respectivamente). En ambos ensayos se observó que en condiciones basales, las células epiteliales manifestaron una ligera expresión del transcrito de MMP-7 (carril 1) mientras que las células que fueron estimuladas únicamente con OPN mostraron un ligero incremento en la expresión de esta enzima respecto al control (carril 3). Por otra parte, el tratamiento con PMA indujo un aumento evidente en la expresión de matrilisina (carril 2) y este aumento fue mayor cuando se combinaron los estímulos (PMA+OPN) (carril 4).

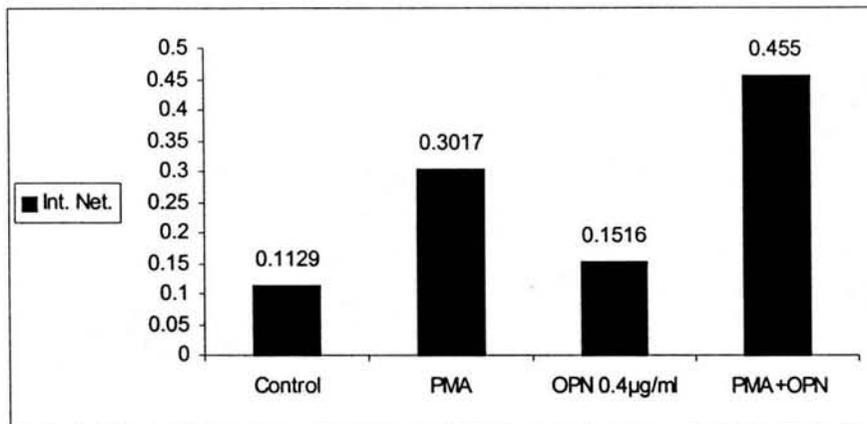
El análisis densitométrico, ajustando el nivel del transcrito de MMP-7 con el nivel del RNAr 18S, reveló que la OPN por si sola incrementa en 34% los niveles de expresión de MMP-7 respecto al control, mientras para PMA el incremento fue del 167%. Por último, los resultados de este análisis mostraron que la OPN tiene un efecto aditivo cuando se combina con PMA ya que en este caso la OPN aumento en aproximadamente 50% los niveles de MMP-7 que se registraron cuando las células fueron incubadas únicamente con PMA y el incremento fue de 4 veces más respecto al control que siempre se mantuvo en medio sin suero.

**A**



**B**





**Figura 6.** Efecto del PMA y OPN sobre la expresión de MMP-7 en células epiteliales.

## DISCUSIÓN y CONCLUSIÓN.

La OPN es una proteína multifuncional que se encuentra expresada en varios tejidos y diferentes tipos celulares y se ha demostrado que posee propiedades muy semejantes a la de una citocina/quimiocina (46). Varios estudios en fibrosis experimental han sugerido un posible papel profibrótico de la osteopontina. En fibrosis renal se ha establecido que la OPN incrementa el reclutamiento de macrófagos y estimula el desarrollo de la cicatrización renal después de un daño isquémico agudo (54). Por otro lado, en la fibrosis pulmonar experimental se ha sugerido que la osteopontina producida por macrófagos alveolares funciona como una citocina fibrogénica (32).

Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas el balance entre MMP's e inhibidores es central en la remodelación de la matriz extracelular. En este estudio analizamos el efecto de la osteopontina sobre la expresión de la colagenasa-1 (MMP-1) en fibroblastos de pulmón humano normal y la matrilisina (MMP-7) en la línea epitelial A549.

En cuanto a la expresión de la MMP-1, los resultados de este estudio revelaron que la OPN produce una considerable disminución en los niveles de RNAm de esta enzima en los fibroblastos normales. En este caso, la disminución de la expresión de MMP-1 tuvo un comportamiento dosis-respuesta, ya que conforme se aumentó la concentración de OPN disminuía la expresión de la enzima. Por su parte, el FGF-1+H indujo una sobre-expresión de la colagenasa intersticial, tal y como previamente ya se había reportado en nuestro laboratorio (47).

Estudios previos, han demostrado que los fibroblastos de pulmón humano pueden o no expresar a la colagenasa-1 (MMP-1) en condiciones basales. Para reforzar el hallazgo de que la OPN puede disminuir la expresión de la MMP-1, se utilizaron fibroblastos que en condiciones basales no expresan esta enzima y que fueron estimulados con PMA, ya que se sabe que este es un potente inductor de la transcripción de MMP-1 (55). De manera interesante los resultados obtenidos muestran que la OPN es capaz de abatir prácticamente a la mitad la expresión de MMP-1 inducida por el PMA.

El hecho de que en fibroblastos humanos, la OPN haya causado una importante reducción de la expresión de MMP-1 es un hallazgo importante ya que esta enzima es una de las responsables principales de la degradación de matriz extracelular, y su disminución puede inducir un microambiente no degradativo, aumentando la acumulación progresiva de colágena como sucede en enfermedades fibrosantes, como la fibrosis pulmonar idiopática (56). Es importante destacar que el TGF- $\beta$ 1 la cual es considerada como una citocina "profibrótica", también reduce la expresión de MMP-1 (20).

Otro punto trascendental de este trabajo fue el hecho de que la OPN indujo la sobreexpresión de matrilisina (MMP-7) en células epiteliales A549. Se ha demostrado previamente que en fibrosis pulmonar idiopática las células alveolares epiteliales del pulmón expresan *in vivo* MMP-7 (32). Esta enzima tiene gran afinidad por heparina y es capaz de degradar varios sustratos de matriz como proteoglicanos, laminina, fibrina/fibrinógeno y otros. Es importante destacar que la MMP-7 puede cortar a la osteopontina y que una vez cortada, la OPN tiene una

actividad mayor en promover tanto la adhesión celular como la migración, comparada con la OPN completa (44).

En este contexto, este estudio sugiere que la OPN puede tener un efecto profibrosante, por la regulación de metaloproteinasas disminuyendo la producción de MMP-1 por fibroblastos y aumentando la producción de MMP-7 en células epiteliales alveolares.

## REFERENCIAS.

1. Pardo A., Selman M. Matriz Extracelular en: Biología celular y molecular, pp 515-540. Eds. Jiménez L.F. y Merchant H. Ed. Prentice Hall, 2003.
2. Brown JC, Timpl R. The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**:484, 1995.
3. Van der Rest M, Garrone R. The collagen family of proteins. *FASEB J.* **5**: 2814-2823, 1991.
4. Pardo A. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp.* **6**: 156, 1993
5. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 375-413, 1996.
6. Rucker RB, Dubick MA. Elastin metabolism and chemistry: potential roles in lung development and structure. *Environ Health Perspect*, **53**: 179-191, 1984.
7. Patel RS, Odermatt E, Schwartzbauer JE, Hynes RO. Organization of the fibronectin gene provides evidence for exon shuffling during evolution. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* **6**: 2565-2572, 1987.
8. Sasaki M, Kleinman HK, Huber H, Deutzman R, Yamada Y. Laminin a multidomain protein: A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J. Biol. Chem.* **263**: 16536-16544, 1998.

9. Winkler Margaret K, Fowlkes John L. Metalloproteinase and growth factor interactions: do they play a role in pulmonary fibrosis?. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **283**: L1-L11, 2002.
10. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**: 1014-1022, 1962.
11. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**: 21491-21494, 1999.
12. Sternlicht MD, Werb Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 463-516, 2001.
13. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 728-738, 1995.
14. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of lung injury. In: *Collagenases*. W. Hoeffler ed, R.G. Landes Company pp. 221-239, 1999.
15. Massova I, Kotra L, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *FASEB J.* **12**: 1075-1095, 1998.
16. Woessner F. The Matrix metalloproteinases family. In *Matrix Metalloproteinases*. Ed. Parks WC, Mecham. Academic Press. 1-14, 1998.
17. Birkedal-Hansen H. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**: 197-250, 1993.
18. Shapiro SD. Matrix metalloproteinases degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 602-608. 1998.
19. Pei D, Kang T, Qi H. Cysteine Array Metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 Is a Type II Transmembrane Matrix Metalloproteinase Regulated by a Single

- Cleavage for Both Secretion and Activation. *J. Biol. Chem.* **275**: 33988-33997, 2000.
20. Uría JA, Jiménez MG, Balbín M, Freije JMP, López-Otín C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **273**: 9769-9777, 1998.
21. Pardo A, Selman M. Molecular Mechanisms of Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Bioscience* 7. Pp. 1-18, 2002.
22. 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.
23. Marchenko GN, Ratnikov BI, Rozanov DV, Godzik A, Deryugina EI, Strongin AY. Characterization of metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. *Biochem. J.* **356**: 705-718, 2001.
24. Vu TH, Werb Z. Matriz metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* **14**: 2123-2133, 2000.
25. Gómez D, Alonso D, Yoshiji D, Thorgeirsson UP. Tissue Inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* **74**: 111-122.
26. Uhal BD, Iravati J, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am. J. Physiol.* **275**: L1192-L1199, 1998.

27. Willenbrock F, Murphy G. Structure-function relationships in tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**: 165-170, 1994.
28. Whitelock JM, Paine ML, Kefford RF, O'Grady RL. Multiple levels of post-transcriptional regulation of collagenase (matrix metalloproteinase-1) in an epithelial cell line. *Immunol. Cell Biol.* **71**: 39-47, 1993.
29. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* **4**: 157-64, 2002.
30. Petrow PK, Hummel KM, Schedel J, Franz JK, Klein CL, Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Chang PL, Prince Cw, Gay S. Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis: effects of osteopontin on the release of collagenase 1 from articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **43**: 1597-1605, 2000.
31. Dunsmore SE, Saarialho-Kere UK, Roby JD, Wilson CL, Matrisian LM, Welgus HG, Parks WC. Matrilysin Expression and Function in Airway Epithelium. *J. Clin. Invest.* **102**: 1321-1331, 1998.
32. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *PNAS* **99**: 6292-6297, 2002.
33. Senger DR, Perruzzi CA. Cell migration promoted by a potent GRGDS-containing thrombin-cleavage fragment of osteopontin. *Biochim. Biophys. Acta* **1314**: 13-2, 1996.

34. O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.* **81**: 373-390, 2000.
35. Hu DD, Hoyer JR, Smith JW. Characterization of the interaction between integrins and recombinant human osteopontin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **760**: 312-314, 1995.
36. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* **271**: 509-512, 1996.
37. Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I. The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGKR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J. Biol. Chem.* **274**: 36628-36334, 1999.
38. Crawford HC, Matrisian LM, Liaw L. Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo. *Cancer Res.* **58**: 5206-5215, 1998.
39. Gadeau AP, Campan M, Millet D, Candresse T, Desgranges C. Osteopontin overexpression is associated with arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Arterioscler. Thromb.* **13**: 120-125, 1993.
40. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimulus in vivo. *Am. J. Pathol.* **152**: 353-358, 1998.
41. Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J. Clin. Invest.* **101**: 1468-1478, 1998.

42. Nau GJ, Guilfoile P, Chupp GL, Berman JS, Kim SJ, Kornfeld H, Young RA. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 6414-6419, 1997.
43. Weber GF, Ashkar S. Stress response genes – the genes that make cancer metastasis. *J. Mol. Med.* **78**: 404-408, 2000.
44. Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a Novel Substrate for Matrix Metalloproteinase-3 (Stromelysin-1) and Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin). *J. Biol. Chem.* **276**: 28261-28267, 2001.
45. Noda M, Yoon K, Prince CW, Butler WT, Rodan GA. Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type  $\beta$  transforming growth factor. *J. Biol. Chem.* **263**: 13916-13921, 1988.
46. Takahashi F, Takahashi K, Okazaki T, Maeda K, Ienaga H, Maeda M, Kon S, Uede T, Fukuchi Y. Role of Osteopontin in the Pathogenesis of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**: 264-271, 2001.
47. Becerril C, Pardo A, Montañó M, Ramos C, Ramírez R, Selman M. Acidic Fibroblast Growth Factor Induces an Antifibrogenic Phenotype in Human Lung Fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**: 1020-1027, 1999.
48. Giard DJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 1417-1423, 1973.

49. Leiber M, et al. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* **17**: 62-70, 1976.
50. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159, 1987.
51. Thomas P. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 5201-5205, 1980.
52. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517, 1975.
53. Feinberg AP, Volgestein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137-266, 1984.
54. Persy VP, Verhulst A, Ysebaert DK, De Greef KE, De Broe ME. Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice. *Kidney Int* **63**: 543-553, 2003.
55. Pardo A, Selman M, Ramírez R, Ramos C, Montaña M, Stricklin G, Raghu G. Production of Collagenase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases by Fibroblasts Derived from Normal and Fibrotic Human Lungs. *Chest* **102**: 1085-1089, 1992.
56. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A. TIMP -1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? *Am J Physiol* **279**: L562-L574, 2000.