



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

Facultad de Ciencias

Actividad gelatinolítica en fibrosis pulmonar inducida por
bleomicina en ratones transgénicos que sobre expresan MMP

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A :

Paul Daniel Jara Peláez

Tutor(a): Dra. Annie Pardo Semo

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Jara Peláez Paul Daniel 56 18 82 23 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 095291944</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Annie Pardo Semo</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. Maria de Lourdes Segura Valdez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 M. en C. Maria de los Remedios Josefina Ramírez Rangel</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Biol. Jorge Antonio García Alvarez</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Biol. Maria Sandra Cabrera Benítez</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Actividad gelatinolítica en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones transgénicos que sobre expresan MMP-9 30 p 2006</p>

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Pulmonares Crónico-degenerativas de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), bajo la dirección de la Dra. Annie Pardo Semo.

Agradecimientos

Dra. Annie Pardo Semo

Por la apertura de tiempo, espacio, y sobre todo experiencia que con las puertas abiertas puso a mi alcance para mi desarrollo académico y para la culminación de este trabajo de tesis.

M. en C. Remedios Ramírez

Gracias por todas las horas que con dedicación y profesionalismo pasaste enseñándome todas las herramientas experimentales que atesoro como los conocimientos más trascendentales de mi joven vida académica en el campo de la investigación, pero sobre todo gracias por tu amistad y apoyo.

Biólogo Jorge García

Gracias por tu amistad y por la disposición y buen ánimo que siempre tuviste para aclarar cualquiera de mis dudas y por la facilidad con la que siempre aportas tu experiencia cuando algún experimento no sale como se esperaba.

Dr. Moisés Selman

Por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis y por las facilidades brindadas en el uso de las instalaciones del INER.

Dr. Luís Felipe Jiménez y Dra. Lourdes Segura

Por haber enseñado con su entusiasmo y conocimientos que área de las ciencias biológicas quería estudiar con más interés y con el cual hoy me encuentro feliz.

Dra. Blanca Cruz Ulloa

Gracias por enseñarme que el estudio de las ciencias biológicas esta lleno de maravillas y satisfacciones, estoy contento de haberla conocido en el momento de la elección de mi profesión.

Ing. Fernando Serna de la Mora

Por haberme enseñado que no importa que tan adversas parezcan las circunstancias políticas en el país lo importante es seguir adelante con trabajo y esfuerzo.

Bióloga Sandra Cabrera

Gracias por haber sido mi guía en el trabajo de esta tesis, por tus consejos y experiencia.

Ala Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme formado académica y personalmente, es un orgullo representarte y formar parte de ti.

A mis padres Verónica y Paul, gracias por todas las horas de desvelo que pasaron a mi lado, gracias por todas las visitas a mis escuelas durante la educación básica y gracias por haberme puesto a la mano lo necesario y más para que nunca dudara en terminar mis estudios.

A mi amada Alma Zamora por haber cambiado mi vida. Con tu amor, confianza y apoyo eres parte constitutiva de este logro. Te amo.

A mis hermanos Alejandro y Mariana que me acompañaron en los momentos difíciles y alegres durante todos estos años.

A Miguel Gracia Valencia por haber estado siempre ahí en cualquier circunstancia, gracias por tu apoyo, confianza y sobre todo tu amistad incondicional.

Índice

Resumen

Introducción

Matriz Extracelular	1
Proteínas colagénicas	1
Elastina	2
Glicoproteínas	3
Glicosaminoglicanos	3
Metaloproteasas de Matriz	4
Regulación de las MMP's	9
Fibrosis Pulmonar	9

Objetivo	12
-----------------	-----------

Materiales y métodos

Población de estudio	13
Modelo de fibrosis inducida por bleomicina	13
Lavados bronquio-alveolares (LBA)	13
Extracción de proteínas de Pulmón	14
Determinación de proteínas	15
Zimografía de gelatina	16
Densitometría de geles	18

Resultados

Zimografía de pulmones y LBA de ratones WT y TG sin tratamiento 19

Zimografía de LBA de ratones instilados con bleomicina 20

Discusión y Conclusiones 26

Referencias 28

Resumen

La fibrosis pulmonar difusa, es el resultado de un heterogéneo conjunto de padecimientos respiratorios que se caracteriza por un desequilibrio entre síntesis y degradación de la matriz extracelular (MEC) resultando en la distorsión de la arquitectura pulmonar. La fibrosis pulmonar puede ser provocada por la inhalación de partículas inorgánicas como sílice y por la inhalación de partículas orgánicas como antígenos aviarios. Ciertas drogas pueden también causar fibrosis pulmonar, como por ejemplo la **bleomicina**. En esta droga se ha basado el desarrollo de modelos experimentales en ratones, ratas y otras especies. Este modelo experimental, comienza con un daño pulmonar donde se presenta un proceso inflamatorio que deriva en: un desorden tisular; exagerado depósito de matriz extracelular; proliferación celular mesenquimatosa y alteración de la arquitectura normal del pulmón comprometiendo el intercambio gaseoso.

El objetivo de este trabajo fue analizar mediante el uso de la zimografía de gelatina, la actividad de la gelatinasa B en el desarrollo del modelo experimental de fibrosis inducida por la aplicación de una dosis de bleomicina. El seguimiento del desarrollo de la fibrosis se dio por un periodo de cuatro meses a través de lavados bronquio-alveolares (LBA) de pulmones de ratón transgénicos que sobre-expresan gelatinasa B humana y una cepa de ratones silvestres para la gelatinasa B.

El estudio de los LBA a través de la zimografía tanto de los ratones transgénicos como de los ratones silvestres para la MMP-9 no mostró diferencias significativas en las formas activas y latentes de esta metaloproteasa, por lo que se propone que el análisis por zimografía sea directamente de los pulmones tratados y/o de los botones celulares que contienen los macrófagos alveolares.

Cabe señalar que en este estudio si se encontraron diferencias en las bandas de actividad de la MMP-9 de alto peso molecular correspondientes a asociaciones multiméricas de la misma gelatinasa B y a asociaciones con otras moléculas como microglobulinas y a variantes de ambos casos como se ha reportado en publicaciones mencionadas en la redacción de la tesis.

Introducción

Matriz Extracelular

La Matriz extracelular (MEC) desempeña un papel esencial en la arquitectura y homeostasis de los tejidos. Además de proporcionar un soporte tisular, interviene en la regulación de procesos básicos de las células y los tejidos gracias al alto grado de organización y especialización de sus componentes y provee un ambiente propicio para la activación e inactivación de factores de crecimiento y citocinas. El constituyente principal y más abundante de la MEC son las colágenas fibrilares. En los animales, equivalen a una tercera parte de la masa proteica y son secretadas por una variedad de células, predominantemente fibroblastos y miofibroblastos, células especializadas que intervienen en proceso de cicatrización. Junto con la colágena, una variedad de constituyentes macromoleculares contribuyen a la complejidad estructural y funcional de la MEC; por ejemplo, proteínas como la elastina confieren flexibilidad y elasticidad a la MEC, mientras que los glicosaminoglicanos tienen funciones de adhesión, retención y flujo de agua y solutos dentro de los tejidos (1-2).

Variaciones en la cantidad de los diferentes componentes macromoleculares de la MEC dan lugar a una gran diversidad de formas, cada una adaptada a las características funcionales de los tejidos en particular; por ejemplo, la MEC puede adquirir una estructura dura calcificada en los huesos y dientes o transparente y delgada en la cornea. Además, en la intersección entre el epitelio y el tejido conectivo la MEC forma la lámina basal, término usado para referirse a una delgada y flexible variedad de la MEC compuesta principalmente por fibras de colágena tipo IV y laminina. La lámina basal es capaz de determinar la polaridad celular, influenciar en el metabolismo, proliferación o diferenciación para la migración celular.

Proteínas colagénicas.

La colágena funciona como un andamio estructural necesario para la organización de las células que constituyen los tejidos gracias a su capacidad de soporte y elasticidad. Las proteínas colagénicas son una clase heterogénea de moléculas que forman parte de una superfamilia de genes altamente relacionados. Se definen como proteínas

estructurales de matriz, caracterizada por repeticiones de una secuencia de tres aminoácidos (*Gly, X, Y*), donde aproximadamente el 30% de las posiciones *X* y *Y* están ocupadas por prolina e hidroxiprolina respectivamente. Este arreglo le confiere a la colágena la propiedad de soporte de la tensión mecánica al formarse un arreglo de triple hélice de cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales gira a mano izquierda alrededor de cada 3.3 residuos de aminoácido por cada vuelta (2).

Las colágenas y proteínas con dominios tipo colágena forman una gran superfamilia en varias especies, y el número de miembros conocidos está en constante crecimiento. Los vertebrados tienen al menos 27 tipos de colágenas con 42 cadenas polipeptídicas diferentes, más de 20 proteínas adicionales con dominios tipo colágena con una estructura de triple hélice (3).

En la tabla 1 se muestra una clasificación que agrupa algunos tipos de colágenas de acuerdo a su función y localización.

Tabla 1

Colágenas	Tipo	Localización
Formadora de Fibras o Fibrilares	I, II, III, V y XI	Piel, hueso, tendón, ligamentos, cornea.
Formadora de Laminas	IV, VIII y X	Membranas basales.
Asociada a Fibras	IX, XII y XIV	Cartílago hialino, humor vítreo asociadas a colágena tipo II, Tendón y piel embrionarios asociadas a colágena tipo I.
Formadora de Filamentos en Rosario	VI	Matrices del estroma que interactúan con fibrillas y células.
Formadora de Fibras de anclaje	VII	Filamentos de anclaje que se unen a membranas basales epiteliales.

Elastina

Otra de las proteínas que componen la MEC es la elastina, una proteína compuesta de dos segmentos repetidos cortos que se alternan a lo largo de la cadena polipeptídica.

El primer segmento es altamente hidrofóbico gracias a que su composición de aminoácidos se caracteriza por la ausencia de aminoácidos ácidos o básicos, siendo sus componentes principales la valina y otros aminoácidos hidrofóbicos, que le confieren su capacidad elástica, mientras que el otro segmento que se intercala en la cadena polipeptídica es rica en lisina y alanina, formando un segmento en α -hélice con puentes que se entrecruzan con las moléculas adyacentes (2, 4).

La elastina es una proteína que presenta un alto grado de distensibilidad reversible e incluso tiene la capacidad de deformarse en grandes extensiones con pequeñas fuerzas. La elastina es secretada al espacio extracelular donde forma filamentos y laminas resultando en una red.

Otras glicoproteínas

La fibronectina es una glicoproteína que se encuentra en todos los vertebrados. La fibronectina es un dímero compuesto de dos subunidades grandes unidas en un extremo por un puente disulfuro. Todas las formas de fibronectina están codificadas por un solo gen que contiene alrededor de 50 exónes de similar tamaño. El mRNA de fibronectina es modificado alternativamente produciendo las isoformas conocidas (solubles y fibrilares) de fibronectina.

Muchas proteínas en la MEC se cree tienen un papel importante guiando los movimientos celulares durante el desarrollo. Las tenacinas, por ejemplo, se componen de diferentes tipos de secuencias cortas de aminoácidos repetidas varias veces formando distintos dominios funcionales. Estos pueden también promover e inhibir la adhesión dependiendo del tipo celular. Lo cual de hecho es muy importante durante la migración celular como guía a través de las interacciones célula-matriz.

Formando parte de la lamina basal se encuentra la laminina, una proteína flexible compuesta por tres cadenas polipeptídicas largas (α , β , y γ). La laminina tiene una forma como de cruz asimétrica unida por puentes disulfuro. Dependiendo de las isoformas de cada una de las cadenas polipeptídicas se pueden asociar entre si diferentes combinaciones para formar la familia de las lamininas. En la membrana basal, la laminina se une a diferentes receptores en la superficie de las células (2).

Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAG's), forman cadenas de polisacáridos no ramificados compuestos por la repetición de disacáridos. Son llamados así, dado que una o ambas

azúcares en la repetición de disacáridos es siempre un amino-azúcar (N-acetilglucosamina ó N-acetilgalactosamina), la cual en la mayor parte de los casos se encuentra sulfatada. El segundo azúcar es comúnmente ácido urónico. De acuerdo a sus azúcares y la unión al grupo sulfato, se distinguen cuatro grupos principales: 1) ácido hialurónico, 2) condroitín sulfato y dermatán sulfato, 3) heparán sulfato, y 4) queratán Sulfato. Los GAG's tienden a adoptar conformaciones altamente extensas que ocupan un gran volumen comparado con su masa. Su alta densidad de cargas negativas atrae una nube de cationes osmóticamente activa, causando que, grandes cantidades de agua sean retenidas en la MEC (2, 4).

Los proteoglicanos se componen de cadenas de GAG's unidas covalentemente a un núcleo proteico. A excepción de el ácido hialurónico, todos los GAG's que conforman la MEC se encuentran en forma de proteoglicanos. Se piensa que los proteoglicanos tienen una función principal en el señalamiento químico entre células.

Metaloproteasas de Matriz

En condiciones fisiológicas existe un delicado equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes moleculares de la MEC y la pérdida de este equilibrio está asociado a varias condiciones patológicas (1, 5).

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de enzimas que son virtualmente capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular y además tienen actividad catalítica sobre diversos componentes diferentes de la MEC como por ejemplo citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (5, 6). Las MMPs desempeñan un papel central en la morfogénesis, curación de heridas, reparación tisular y remodelación en respuesta al daño y en la progresión de enfermedades como la artritis, cáncer, úlcera tisulares crónicas, enfisema y fibrosis pulmonar entre otras (5-9).

Las MMPs también llamadas matrixinas pertenecen a la superfamilia de las Metzicinas, que además incluyen a las serralisinas, las adamalisinas, la astracinas. Son endopeptidasas que comparten una topología estructural conservada y contienen un motivo altamente conservado de tres histidinas de unión al zinc en el sitio catalítico y una metionina conservada que gira y se asienta en el sitio activo de unión al zinc.

La familia de las MMPs está constituida por varios miembros que se ilustran en la Tabla 2. En el caso de los humanos existen 23 MMPs.

Tabla 2

MMP	Nombre común	Organización de Dominios
MMP-1	Colagenasa-1	B
MMP-2	Gelatinasa A	C
MMP-3	Estromelisina-1	B
MMP-7	Matrilisina	A
MMP-8	Colagenasa-2	B
MMP-9	Gelatinasa B	C
MMP-10	Estromelisina-2	B
MMP-11	Estromelisina-3	D
MMP-12	Metaloelastasa de Macrófago	B
MMP-13	Colagenasa-3	B
MMP-14	MT1-MMP	E
MMP-15	MT2-MMP	E
MMP-16	MT3-MMP	E
MMP-17	MT4-MMP	F
MMP-18	Colagenasa-4 (Xenopus)	B
MMP-19	RASI-1	B
MMP-20	Enamelisina	B
MMP-21	XMMP (Xenopus)	G
MMP-22	CMMP (Pollo)	B
MMP-23	CA-MMP	H
MMP-24	MT5-MMP	E
MMP-25	MT6-MMP	F
MMP-26	Endometasa Matrilisina-2	A
MMP-27		B
MMP-28	Epilisina	D

Las MMP's, 4 y 5 no existen pues resultaron ser las mismas que MMP-2 y 3.

Los dominios estructurales conservados por las MMP's son tres: Pre-dominio, Pro-dominio y Dominio catalítico de unión a Zinc. Por lo menos dos MMP's (MMP-7 y MMP-26) se componen únicamente por estos dominios, por lo que son conocidos como dominios mínimos (8, 10).



Organización A de los dominios. Dominios mínimos. Grupo SH

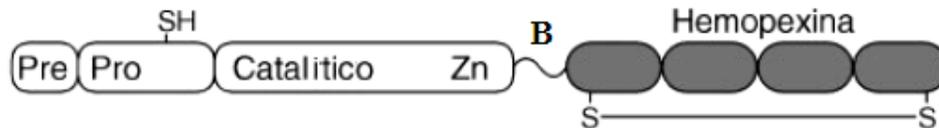
El Pre-dominio es un péptido señal que dirige la síntesis de la proteína al retículo endoplasmático para la secreción extracelular.

El Pro-dominio mantiene inactivas a las MMP's en el espacio extracelular. Está constituido por alrededor de 80 aminoácidos conteniendo la secuencia consenso PRCXXPD. En este dominio se encuentra un residuo de cisteína que forma un enlace coordinado con el Zinc del sitio catalítico impidiendo su actividad. Para la activación de las MMP's es necesario que el Pro-dominio sea retirado ya que todas las MMP's son secretadas como zimógenos al espacio extracelular.

El dominio catalítico de unión a zinc contiene la secuencia consenso de unión a zinc HEBXHXBGBXH, donde X es un residuo variable y B es un voluminoso residuo hidrofóbico (8-10). Este dominio contiene también un sitio de unión a calcio que junto con el zinc permiten la actividad proteolítica de las MMP's.

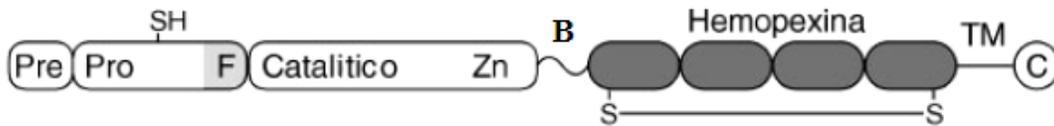
Otro dominio estructural mayoritariamente presente en las MMP's es la región conocida como bisagra de unión. Se caracteriza por ser rica en prolina y solo está ausente en la MMP-7 y MMP-23.

El dominio carboxilo Terminal tipo Hemopexina se encuentra ausente en MMP-7, MMP-23 y MMP-27. Este dominio contiene 3 ó 4 secuencias repetidas, similares a hemopexina/vitronectina.



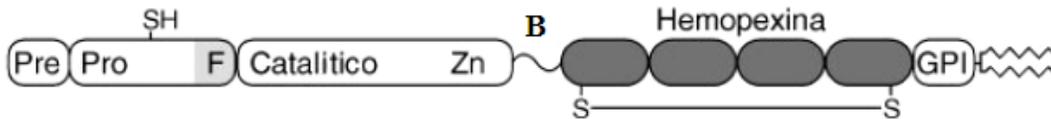
Organización B de los dominios. Dominio simple de Hemopexina. Región B, bisagra.

Existen dominios estructurales específicos dentro de las MMP's. Uno de ellos es el dominio transmembranal citosólico, que se encuentra presente solo en MMP14, 15, 16 y 24, también conocidas como MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP y MT5-MMP respectivamente.



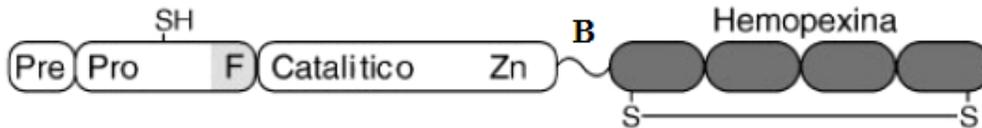
Organización E de los dominios. Dominio transmembranal TM, C citosólico.

Las MMP-17 y MMP-25 también asociadas a membrana, presentan extensiones hidrofóbicas que actúan como señal de anclaje a la membrana por glicosil-fosfatidil-inositol.



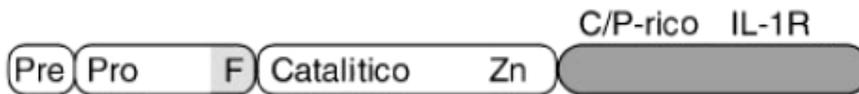
Organización F de los dominios. Dominio de unión al glicofosfatidil inositol.

Dominio tipo Furina, que es un sitio que permite la activación intracelular mediante la hidrólisis de un enlace peptídico (8, 10).



Organización D de los dominios. Dominio susceptible a furina, F.

La MMP-23 posee un dominio único rico en Prolina /Cisteína y receptor tipo II de IL-1.



Organización H de los dominios. Receptor de interleucina-1. C/P cisteína prolina.

Las MMP-2 y MMP-9 también llamadas gelatinasas se distinguen además por la inserción de tres cabezales ricos en cisteína en el dominio catalítico. Estos insertos repetidos de unión a colágena tipo II y fibronectina son requeridos para remover la unión de la Colágena a la Elastina. Adicionalmente, la MMP-9 tiene un inserto único de unión a colágena tipo V altamente glicocilado, el cual puede estar relacionado con la especificidad de sustrato y resistencia a la degradación.



Organización C de los dominios. Unión a colágena, fibronectina tipo II.

De acuerdo a la estructura de los dominios, y de la afinidad por el sustrato, las MMP's se han clasificado en 6 subfamilias diferentes que se ilustran en la tabla 3.

Tabla 3

Subfamilia	Características
Colagenasas	Incluye MMP-1, MMP-8 y MMP-13. Se especializan en degradar colágenas fibrilares tipos I, II, y III. So expresadas por diferentes tipos celulares.
Gelatinasas	Incluye las MMP-2 y MMP-9. Degradan predominantemente colágena tipo IV presente en membranas basales, colágena tipo V, elastina y colágena desnaturalizada (gelatina).
Estromelisinias	Incluye las MMP-3, MMP-10 y MMP-11. Tienen preferencia por sustratos como Fibronectina, Laminina y la porción que no forma triple hélice de la colágena IV.
Matrilisinias	Incluye las MMP-7 y MMP-26. Degrada sustratos dentro de la MEC tales como Fibronectina y fibrinogeno. Esta subfamilia carece del dominio carboxilo Terminal.

MMP`s de membrana	También conocidas como MT-MMP`s tienen un dominio transmembranal y una pequeña cola citoplásmica. Presenta un sitio de unión a furina para su activación intracelular. Son capaces de activar otras MMP`s e incluyen las MMP`s- 14, 15, 16, 17, 24, 25.
Otras MMP`s	Incluye a las MMP-12, MMP-19, MMP-21, MMP-23, MMP-27 y MMP-28. Por sus características no es posible asociarlas a una subfamilia homogénea como las subfamilias anteriores.

Regulación de las MMP`s

La actividad de la mayoría de las MMPs es muy baja o negligible en condiciones basales , pero su expresión es controlada a nivel transcripcional por variadas citocinas, factores de crecimiento y hormonas (8-10). La actividad de las MMPs está también regulada por la activación de zimógenos y la inhibición por varios inhibidores endógenos llamados inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). La familia de los TIMP`s comprende cuatro miembros denominados TIMP-1, 2, 3 y 4. Los TIMP`s forman complejos de alta afinidad por las formas activas de las MMP`s a través de una interacción no covalente.

Fibrosis Pulmonar

La fibrosis pulmonar difusa, es el resultado de un heterogéneo conjunto de padecimientos respiratorios agrupados bajo el término de enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), que en términos generales se caracterizan por un desequilibrio entre síntesis y degradación de la matriz extracelular (MEC) que resulta en la distorsión de la arquitectura pulmonar. La clasificación patológica de las enfermedades intersticiales difusas incluye dos grupos generales, neumonía infiltrativa difusa con una presentación histológica específica de causa conocida y enfermedades de causa desconocida o idiopática (11).

Dentro de las EPID de causa conocida se encuentran aquellas provocadas por la inhalación de partículas inorgánicas tales como sílice, asbesto, partículas metálicas y las provocadas por la inhalación de partículas orgánicas como antígenos aviarios. Ciertas drogas pueden también causar fibrosis pulmonar como por ejemplo la bleomicina, un

agente antineoplásico. Colateralmente, en este agente se ha basado el desarrollo de modelos experimentales en ratones, ratas, hámster, perros y otras especies (12, 13). El proceso patológico común para estos casos comienza con un daño pulmonar donde se presenta un proceso inflamatorio que contrarresta el estímulo de reparación tisular causado por la partícula agresora, permitiendo remover organismos infecciosos, si es el caso, e iniciando inmediatamente con la reactivación de las membranas cuya función vital es la de proveer el intercambio gaseoso. Esto normalmente resulta en el retorno a la función normal del pulmón. Sin embargo, en daños titulares crónicos, con repetidos episodios inflamatorios, muchos de los mecanismo de control involucrados y normalmente bien orquestados son pasados por alto. La reparación prolongada deriva en un desorden tisular; exagerado depósito de matriz extracelular; proliferación celular mesenquimatosas y alteración de la arquitectura normal del pulmón comprometiendo el intercambio gaseoso (12)

Por otro lado entre aquellas EPID de causa desconocida se encuentra la fibrosis pulmonar idiopática, FPI, que es considerada la variedad más agresiva entre las enfermedades fibrosantes de pulmón. Los grupos más susceptibles de presentar este padecimiento son adultos de edad media en adelante aunque dos tercios de los pacientes diagnosticados se encuentran por encima de los 60 años, siendo más común en el sexo masculino y con menos de 50 % de supervivencia en apenas 5 años (12). Al contrario de otras EIPD, los pacientes con FPI no parecen responder a los tratamientos clásicos anti-inflamatorios. Esto sugiere que la FPI se caracteriza por una secuencia de eventos diferentes al resto de las EPID en las que al inicio de las patologías se encuentran prologados periodos inflamatorios. Nuestro grupo de trabajo (14) ha propuesto que la FPI inicia con micro lesiones en el epitelio alveolar que son seguidas por la formación de focos de fibroblastos que proliferan y se diferencian en miófibroblastos, que pueden provocar el rompimiento de la membrana basal y apoptosis en las células epiteliales alveolares, perpetuando el daño e impidiendo la regeneración del epitelio. El resultado final es el depósito excesivo de matriz extracelular y la destrucción de las unidades alveolares formando cisternas o espacios que reducen la capacidad respiratoria (12, 14, 15).

Numerosos estudios han mostrado la participación de algunas MMPs en la patogénesis de la FPI (10, 16-18). Entre las enzimas que se ha documentado que están altamente expresadas en FPI y que participan en la patogénesis de este padecimiento se

encuentran emostrado que participan se encuentran la MMP7, la MMP1 y las gelatinasas MMP2 y MMP9 (10, 16-20).

La gelatinasa B es un miembro multifuncional de las MMPs y se considera que una de sus principales acciones biológicas se relaciona con la degradación de membranas basales, tanto en condiciones fisiológicas, i.e. migración transendotelial de los leucocitos, como patológicas, i.e. artritis reumatoide (10, 20).

En el caso de la respuesta pulmonar a las agresiones, se ha demostrado que la integridad de las membranas basales es fundamental para la conducción de una regeneración ordenada después del daño pulmonar y en cambio, la destrucción de las membranas basales favorece la aparición de lesiones fibrosantes.

El posible papel de las gelatinasas en este proceso, ha sido abordado en nuestro laboratorio tanto en modelos experimentales como en la enfermedad humana. Así, hemos determinado que existe una sobre-expresión de ambas enzimas en la agresión subaguda inducida por hiperoxia en ratas y por bleomicina en ratones. (16, 21, 22).

Nuestro principal hallazgo lo constituyó la observación de que focos de fibroblastos/miofibroblastos subepiteliales expresaban gelatinasa B. Es importante señalar que en condiciones fisiológicas, los fibroblastos de tejidos normales producen onstitutivamente MMP-2, pero no sintetizan MMP-9. Este resultado se corroboró in vitro, donde los fibroblastos obtenidos de pulmones con FPI expresaron esta gelatinasa, y más aún, la abundancia del RNA mensajero estaba directamente relacionada con la cantidad de miofibroblastos en el cultivo, lo que sugiere fuertemente que es esta subpoblación la responsable de su síntesis. Asimismo, encontramos que la actividad de esta enzima se encuentra aumentada en el líquido de lavado bronquioalveolar de estos pacientes (16).

Los ratones trangénicos en los que se ha eliminado la expresión de metaloproteasas ha mejorado nuestro comprensión sobre el papel molecular y fisiológico que desempeñan estas enzimas (17, 18). En este contexto, con objeto de avanzar en el conocimiento sobre el papel que desempeña la MMP9 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar se ha desarrollado en el laboratorio el modelo de fibrosis inducido por bleomicina en un ratón transgénico que expresa la MMP9 humana en macrófagos alveolares (19). En este contexto en este trabajo se ha planteado el siguiente objetivo.

Objetivo

Analizar la actividad de la gelatinasa B (MMP-9), en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones transgénicos que sobre-expresan la MMP-9 humana y compararla con la del ratón silvestre.

Materiales y Métodos

Población de estudio

Los ratones utilizados para la realización de este trabajo fueron generados en el laboratorio de la Dra. Jeanine D'Armiento (Division of Molecular Medicine, Department of Medicine, Columbia University, New York, NY). El cDNA de 2.4 kb de la gelatinasa B humana fue insertada bajo el control de un promotor (human Scavenger Receptor-Enhancer Promoter) que permite la expresión específica de la enzima en macrófagos tisulares. El constructo fue microinyectado en huevos de ratón fertilizados (F1 [C57BL/6 x CBA/J] x F1 [C57BL/6 x CBA/J]). Los ratones fueron reproducidos en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). De acuerdo al inventario del bioterio al iniciar los tratamientos nos proporcionaron ratones C57BL/6 machos y hembras de 8 semanas de vida mantenidos por el bioterio en condición libre de patógenos de dos poblaciones genéticas: a) Ratones silvestres para MMP-9 (también conocidos como WT por sus siglas en Inglés Wild-Type) b) Ratones transgénicos que sobre-expresan MMP-9 humana en macrófagos (TG).

Modelo de Fibrosis Inducido por Bleomicina

Para la inducción de fibrosis, los ratones TG y WT fueron tratados con una dosis única de 0.13 unidades de bleomicina, por cada diez gramos de peso del ratón. Los ratones fueron previamente anestesiados con pentobarbital sódico e inmovilizados sobre una mesa de disección en posición ventral y con el cuello expuesto se realizó una pequeña incisión dérmica lo cual expone el timo. Con unas pinzas esterilizadas se separa el timo y se expone la traquea permitiendo la inserción de la aguja con la dosis específica de bleomicina calculada para cada ratón. La incisión es suturada completamente y se aplica una capa de Topazone® en aerosol para evitar infecciones y facilitar la cicatrización. Los ratones son sacrificados y se recuperan los pulmones a los 7 y 30 días posteriores a la instilación para estudiar el desarrollo del proceso inflamatorio y a periodos de 2, 3 y 4 meses para seguir el desarrollo de la fibrosis (23).

Lavados Bronquio-alveolares (LBA)

Los ratones fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico inyectada intraperitonealmente. Consecutivamente al sacrificio de los ratones, los pulmones son

lavados dos veces con alícuotas de 600 μ L de solución salina estéril a través de un catéter de punta fina que se introduce en la tráquea de los ratones. La solución salina es recuperada por aspiración con una jeringa y se centrifuga por 15 minutos a 1500 revoluciones por minuto a 4°C y se recupera el sobrenadante separándolo de las células que pudiera contener el LBA y se conserva a -70°C. El LBA se utilizó para analizar la expresión gelatinolítica del proceso inflamatorio y fibrosante mediante zimografía de gelatina en los cortes temporales antes mencionados.

Extracción de Proteínas de Pulmón

Después de que se obtuvieron los LBA, los pulmones son colocados en viales y son conservados en nitrógeno líquido para que las proteínas se conserven en buenas condiciones. La extracción de proteínas de pulmón se hizo utilizando la solución de lisis y el buffer CHAPS marca SIGMA[®], el cual se puede preparar en solución para lisis de acuerdo a la cantidad que se va a utilizar como se muestra a continuación:

	10mL	25mL	50mL	100mL	[] Total
CHAPS (C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S)	0.06149	0.1537	0.3075	0.6149	10mM
HEPES (1M pH7.5) (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	200 μ L	500	1 mL	2mL	20mM
NaCl	300 μ L	750	1.5mL	3mL	150mM
CaCl (opcional)	0.014g	0.036g	0.07g	0.14g	10mM

El protocolo de extracción de proteínas con Buffer CHAPS es el siguiente:

- 1) Por cada 30 mg de tejido se utiliza 1mL de Buffer CHAPS.
- 2) Se homogeniza el tejido en el buffer CHAPS perfectamente con el politrón en un tubo de vidrio estéril.
- 3) El homogenizado se recupera en tubos de 2mL y se centrifuga durante 15 minutos a 14 000 revoluciones por minuto (rpm), a 4°C.
- 4) Se recupera la fase media del sobrenadante donde se encuentran las proteínas como se ve en la figura 1, evitando contaminar con otra fase la muestra y se conservan en volúmenes de 50 a 100 μ L a -70°C para el análisis gelatinolítico.

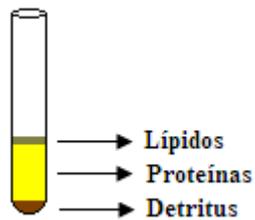


Figura 1. Fases de extracción formadas por el Buffer CHAPS.

Determinación de proteínas

Con el fin de que cada muestra contenga la misma cantidad relativa de proteínas y que sea solo la actividad gelatinolítica, reflejo del proceso patológico o control, lo que se refleje en los zimogramas, es necesario que las muestras tanto de LBA como de tejidos tratados y controles pasen por un proceso de cuantificación de proteínas.

Dado que la concentración de proteínas puede resultar muy diferente entre lavados y tejidos y con la limitante de la cantidad de muestra que se puede obtener se optó por concentrar las muestras previo a la cuantificación de proteínas. Se utilizó el dispositivo de filtración por centrifuga de Microcon[®], el cual además de separar por fuerza centrifuga moléculas menores a 3 kDa, desaliniza las muestras. El procedimiento para la concentración de las muestras se ilustra a continuación:

- 1) El reservorio para las muestras se coloca dentro del vial.
- 2) Las muestras son colocadas dentro del reservorio sin tocar la membrana del fondo hasta un volumen máximo de 500 μ L.
- 3) Se tapa el dispositivo y se centrifuga a 11 000 revoluciones por minuto a 4°C por media hora.
- 4) Se remueve el reservorio para la muestra y se cambia de vial. El reservorio se introduce en sentido opuesto o boca a bajo en el nuevo vial y se centrifuga nuevamente por unos cuantos segundos para que toda la muestra selecta por la membrana del dispositivo caigan en el nuevo vial.
- 5) Se retira el reservorio para muestras y el vial se rotula y se conserva a -70°C para la determinación de proteínas y el análisis de zimografía.

La determinación de proteínas se hace preparando primero una curva teórica de Albúmina sérica bovina 1µg/µL como sigue:

Albúmina (µg/µL)	AGUA (µL)	Colorante Bradford (µL)
0	800	200
2	798	200
4	796	200
6	794	200
8	792	200
10	790	200

Las muestras provenientes de LBA y tejidos experimentales y controles se preparan de la misma manera solo que el valor variable de la albúmina es remplazada por un volumen arbitrario fijo para todas las muestras, por lo regular se utilizo 2µL de cada muestra. Tanto la curva patrón o teórica como las muestras son leídas ala longitud de onda (λ), de 595 nanómetros en el espectrofotómetro y los valores absorbancia de cada muestra son registrados. Se hace una regresión lineal de los valores de la albúmina µg/µL contra los valores de la absorbancia λ , lo cual genera un modelo lineal que nos permite extrapolar los valores de las muestras experimentales para conocer la concentración de proteínas µg/µL.

Zimografía de gelatina

La expresión de las MMP's puede ser analizada con diversas técnicas. Una de ellas ampliamente usada es la zimografía de sustrato, lo cual identifica a las MMP's por la degradación de su sustrato preferencial y por su peso molecular. La zimografía y la zimografía reversa han sido reportadas como técnicas simples, sensitivas y funcionales para el estudio de las MMP's y los TIMP's, respectivamente, a partir de muestras biológicas. Ambas técnicas son la misma solo que difieren entre si dependiendo del tipo de MMP o TIMP que quiere detectarse. En la zimografía las proteínas desnaturalizadas por dodecil sulfato de sodio (SDS) son separadas por electroforesis en condiciones no reductoras. La separación ocurre en un gel de acrilamida que contiene el sustrato específico, el cual es co-polimerizado con la acrilamida (24).

El gel de acrilamida y gelatina donde se corrieron las muestras de proteínas de lavados y tejidos, tratados y controles se compone de dos partes. La parte inferior que se prepara primero al 8.5% como se muestra a continuación y su función es separar por peso molecular las enzimas, mientras que la parte superior o gel concentrador se prepara al 4 % y carece de sustrato, su función es contener los pozos donde se colocan las muestras y concentrarlas antes de entrar al gel separador.

Gel Separador 8.5%

Agua destilada	3.52 mL
Acrilamida/Bis (30% T. 2.67% C)	2.82 mL
Gelatina (10mg/mL)	1 mL
Tris-HCl 1.5M, pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 μ L
Persulfato de Amonio (PSA)	100 μ L
TEMED	20 μ L

Gel Concentrador 4.0%

Agua destilada	6 mL
Acrilamida/Bis (30% T. 2.67% C)	1.3 mL
Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	2.5 mL
SDS 10%	100 μ L
Persulfato de Amonio (PSA)	100 μ L
TEMED	20 μ L

Todas las muestras son ajustadas a 15 μ g para poder correrlas en el gel. La electroforesis se lleva a cabo por alrededor de 45 minutos a un voltaje constante de 200 volts en el buffer de corrida 1X que se prepara de la siguiente forma:

Buffer de corrida 5X, pH 8.3

Tris base	9g
Glicina	43.2g
SDS	3g

Aforar a 600 mL con dH₂O y diluir a 1X antes de usarse

Durante la electroforesis el SDS desnatura las Gelatinasas volviéndolas inactivas. Después de la electroforesis el gel es lavado con otro detergente llamado Tritón X-100 al 2.5% en dos lavados de 15 minutos cada uno con agitación suave. Después de estos lavados las gelatinasas se re-naturalizan parcialmente y recobran su actividad sin necesidad de ser retirado el pro-dominio. Posteriormente el gel es incubado en un buffer apropiado para su activación ya que provee los iones de Zinc y Calcio que la enzima activa necesita para su actividad proteolítica. El buffer de incubación se preparó como sigue:

Buffer de incubación

Glicina 0.1M, CaCl ₂ 5mM pH 8.0	96mL
ZnCl ₂ 5mM	<u>4mL</u>
Total	100mL

Cada uno de los geles es colocado en una estufa para incubación a 37°C por aproximadamente 18 horas. Durante esta incubación, las gelatinasas concentradas y re-naturalizadas digieren el sustrato co-polimerizado con el gel.

Después de la incubación el gel es teñido con Azul de Coomassie® R-250 al 1% solución fijadora en isopropanol al 25% y ácido acético, en dos periodos de 15 minutos cada uno con agitación suave y constante. Posteriormente la solución fijadora es remplazada por otra que se encarga de remover el exceso de colorante, ácido acético al 7.5% y metanol al 5%, hasta que por agitación y el efecto de la solución es posible ver claramente bandas de actividad gelatinolítica.

Densitometría de geles

Las bandas claras reveladas en el gel después de la incubación por el Azul de Coomassie® fueron cuantificadas por densitometría de gel. Los geles son digitalizados con el paquete de captura digital de geles DigiGenius de SYNGENE®. Este paquete incluye además de la cámara digital un software de análisis digital de geles. Las bandas claras de los geles reciben un valor de intensidad asignado por el programa que es reflejo de la actividad gelatinolítica para cada una de las bandas de cada muestra.

Al compararse los valores para cada muestra experimental o control, de cualquier corte temporal, es posible hacer comparaciones entre la actividad gelatinolítica de los casos experimentales WT, TG, y controles en base a los valores otorgados por la densitometría.

Resultados

Zimografía de pulmones y LBA de ratones WT y TG sin tratamiento

Se extrajeron los pulmones de ratones WT y TG y se homogenizaron como se indica en métodos. El sobrenadante de los homogenados se corrió en un gel de poliacrilamida que tenía incorporada gelatina como sustrato. En la figura 2A se ilustra el resultado de tres ratones WT y tres TG sin tratar. El análisis densitométrico de la MMP-9 total mostró que las bandas de actividad de la MMP-9 en ratones TG son significativamente mayores comparados con los ratones WT ($P < 0.05$) (Figura 2B). En la figura 2C se muestra el análisis densitométrico de cada una de las bandas de actividad de MMP-9. La MMP-2 no mostró diferencias significativas entre los ratones WT y TG (Figura 2).

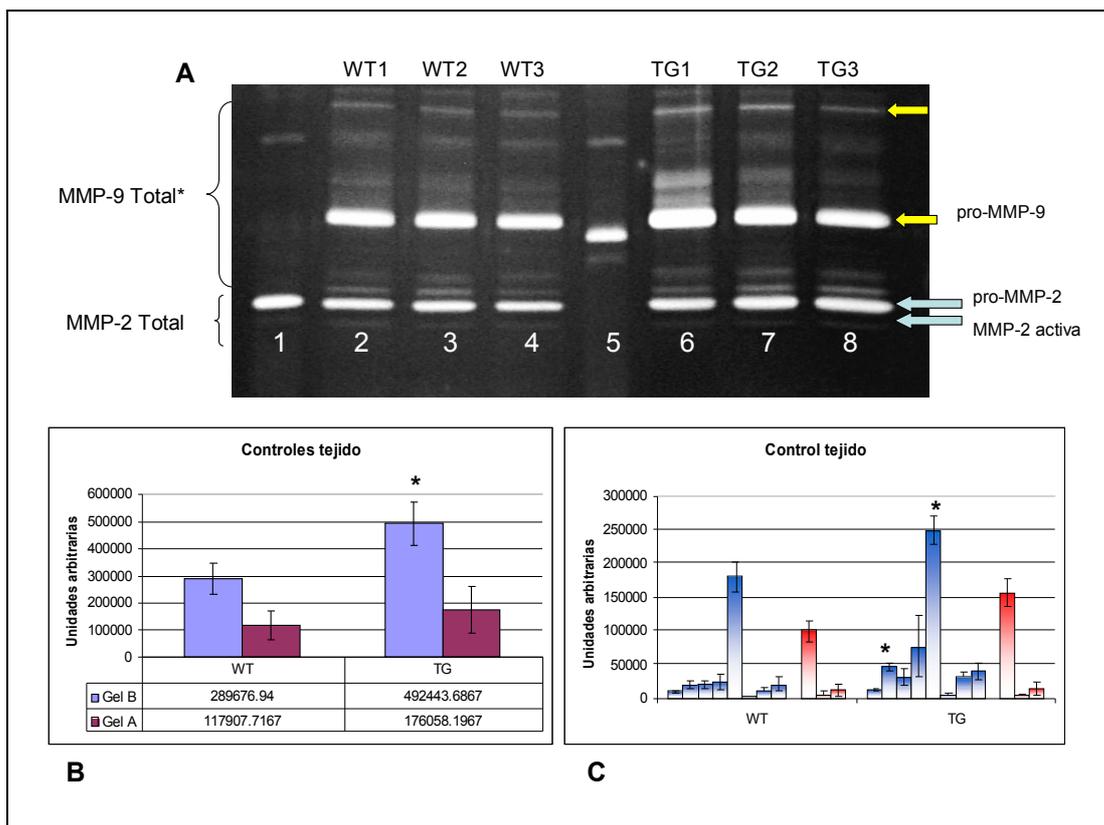


Figura 2. Zimografía de pulmones de ratones sin tratamiento. **A** Zimograma usando gelatina como sustrato. **B** Análisis densitométrico de todas las bandas de actividad correspondientes a la MMP-9 (azul), y a la MMP-2 (rojo) * $P < 0.05$. **C** Análisis densitométrico de cada una de las bandas de MMP-9 (azul) y de MMP-2 (rojo). Las flechas amarillas muestran las bandas con diferencia significativa * $P < 0.05$. El estándar de MMP-2 se muestra en el primer carril a la izquierda y el de MMP-9 humana en el carril número 5.

El lavado bronquio-alveolar de los ratones WT y TG en condiciones básicas se sometió también al análisis de actividad gelatinolítica por medio de zimografía. En la figura 3A se ejemplifica el resultado de tres ratones WT y tres TG. Cuando el gel se sometió al análisis densitométrico reveló que las bandas de actividad de la MMP-9 no se mostraron diferencias significativas entre los ratones TG y los ratones WT (Figura 3B y C). La MMP-2 tampoco mostró diferencias significativas (figuras 3B y C). Es importante destacar que en el caso de los lavados bronquio-alveolares fue evidente la presencia de enzima activa tanto para la MMP-9 como para la MMP-2.

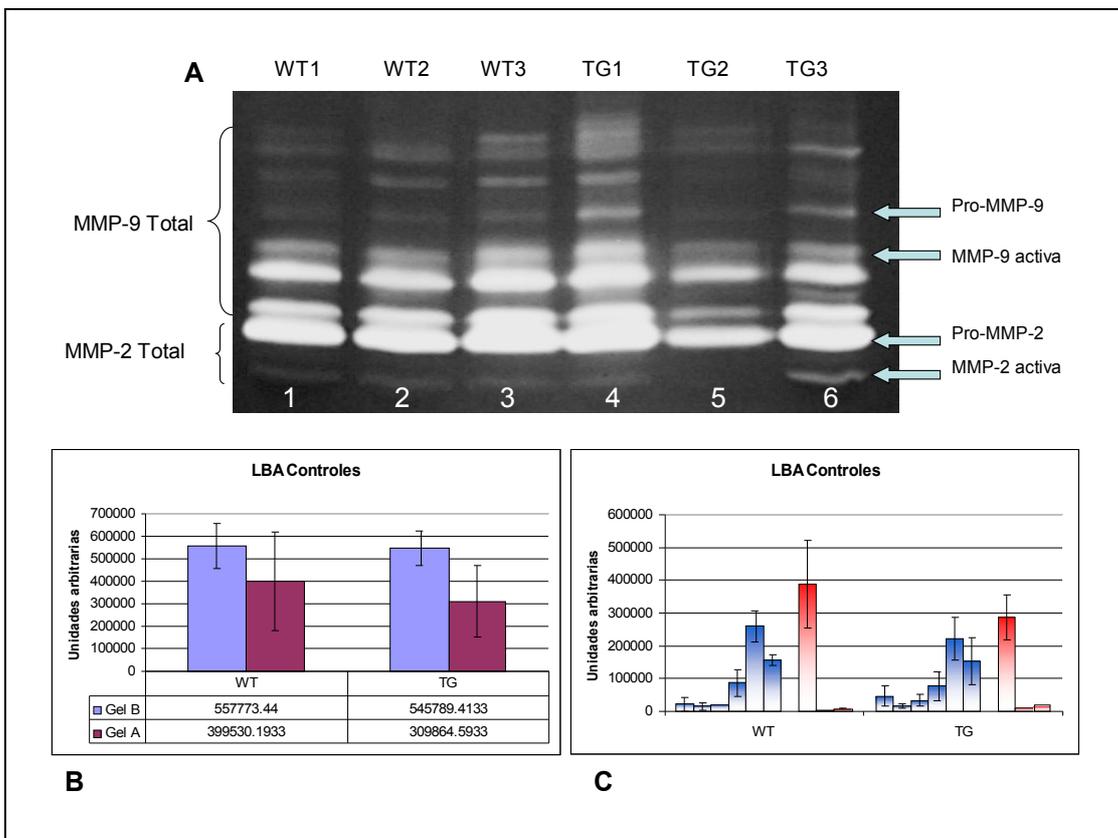


Figura 3. Zimografía de LBA de ratones en condiciones básicas. A Zimograma usando gelatina como sustrato. B Análisis densitométrico de todas las bandas de actividad correspondientes a la MMP-9 (azul), y a la MMP-2 (rojo). C Análisis densitométrico de cada una de las bandas de MMP-9 (azul) y de MMP-2 (rojo).

Zimografía de LBA de ratones instilados con bleomicina

Se analizaron los LBA de ratones WT y TG instilados con bleomicina siete días después del tratamiento y uno, dos, tres y cuatro meses después.

En la figura 4A se muestra el resultado de tres ratones WT y tres ratones TG a los siete días después de la instilación con bleomicina. Como se puede observar la mayor

parte de las bandas que muestran la actividad de la MMP-9 se encuentran en su forma activa tanto en los ratones WT como en los TG. Aun cuando en la MMP-9 total no se encontraron diferencias significativas entre los ratones WT y TG, las bandas de la enzima activa son más definidas en los ratones TG en comparación con los WT. Por otro lado, una banda de alto peso molecular de la MMP-9 se encontró significativamente aumentada en los TG ($P < 0.05$) (figura 4C).

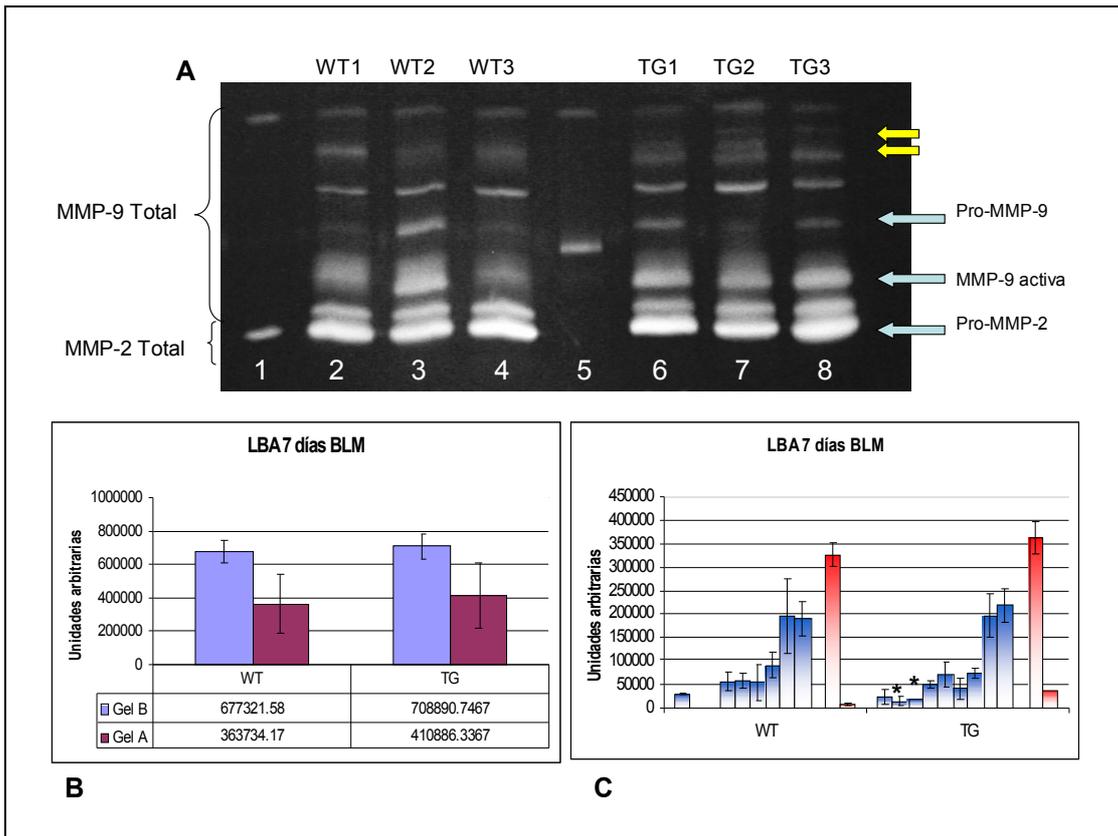


Figura 4. Zimografía de LBA de ratones 7 días post-tratamiento. **A** Zimograma usando gelatina como sustrato. **B** Análisis densitométrico de todas las bandas de actividad correspondientes a la MMP-9 (azul), y a la MMP-2 (rojo). **C** Análisis densitométrico de cada una de las bandas de MMP-9 (azul) y de MMP-2 (rojo) * $P < 0.05$. Las flechas amarillas muestran las bandas con diferencia significativa * $P < 0.05$. El estándar de MMP-2 se muestra en el primer carril a la izquierda y el de MMP-9 humana en el carril número 5.

Posteriormente se corrieron los zimogramas con las muestras de LBA de ratones WT y TG instilados con bleomicina un mes después del tratamiento.

En la figura 5A se muestra el resultado de tres ratones WT y tres ratones TG. Como se puede observar en esta etapa se revela tanto la actividad de la pro-MMP9 como la de la enzima activa tanto en los ratones WT como en los TG. El análisis densitométrico de la MMP-9 total no reveló diferencias significativas entre los ratones

WT y TG; sin embargo, en una banda de alto peso molecular de la MMP-9 se encontró significativamente aumentada en los TG comparadas con WT ($P < 0.05$) (figura 5C).

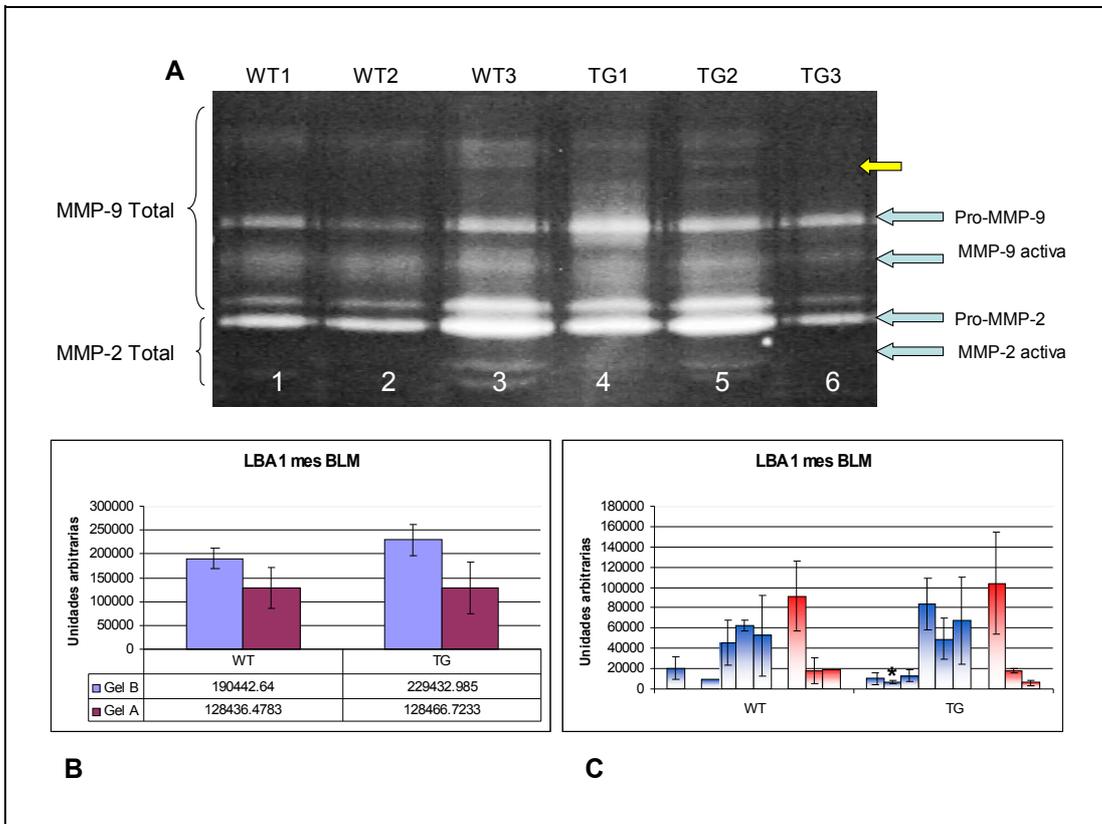


Figura 5. Zimografía de LBA de ratones 1 mes post-tratamiento. A Zimograma usando gelatina como sustrato. **B** Análisis densitométrico de todas las bandas de actividad correspondientes a la MMP-9 (azul), y a la MMP-2 (rojo). **C** Análisis densitométrico de cada una de las bandas de MMP-9 (azul) y de MMP-2 (rojo) * $P < 0.05$. La flecha amarilla muestra la banda con diferencia significativa * $P < 0.05$.

El análisis de los LBA dos meses después de la instilación con bleomicina se muestran en la figura 6 para tres ratones WT y tres ratones TG (Fig. 6A). En el LBA se observaron bandas de actividad de la MMP-9 significativamente mayores en los ratones TG comparados con los ratones WT ($P < 0.05$) (figura 6B). Estas diferencias fueron evidentes para la pro-MMP-9 y algunos polímeros de mayor peso molecular que no se disocian durante la zimografía ($P < 0.05$), mientras que en el caso de la MMP-2 no se encontraron diferencias significativas entre los ratones WT y TG (figura 6C).

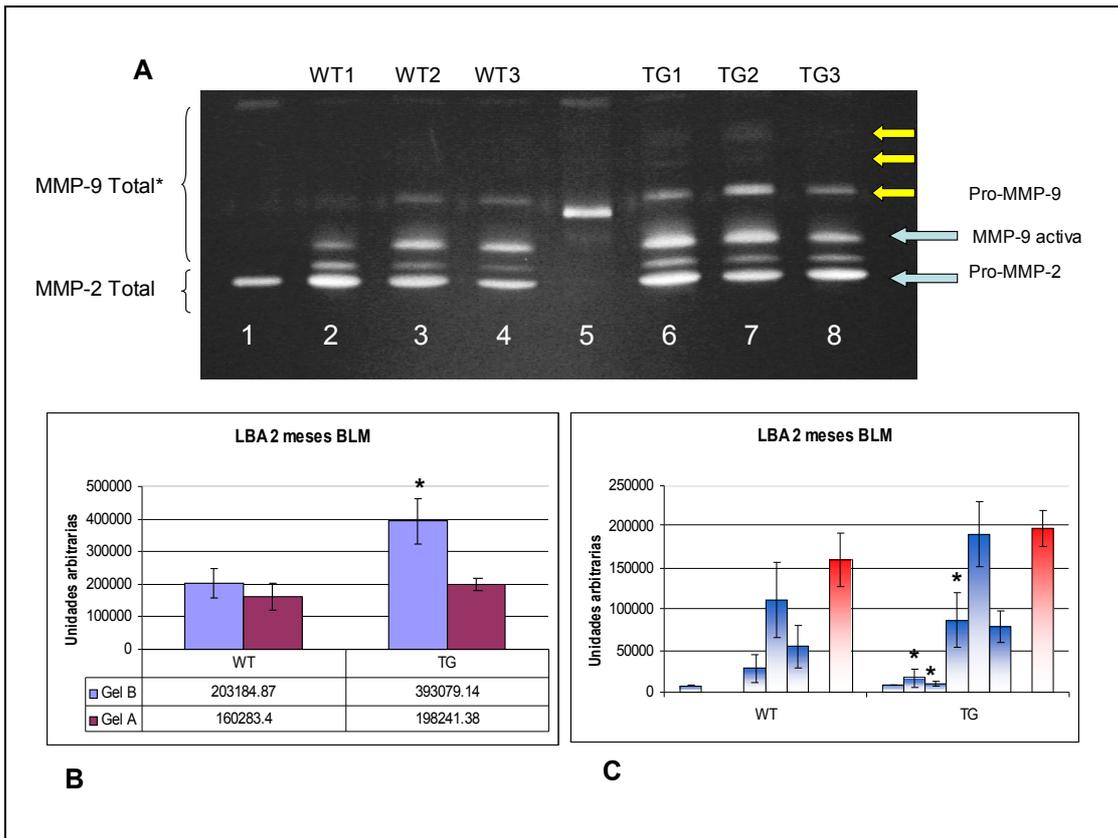


Figura 6. Zimografía de LBA de ratones a 2 meses post-tratamiento. **A** Zimograma usando gelatina como sustrato. **B** Análisis densitométrico de todas las bandas de actividad correspondientes a la MMP-9 (azul), y a la MMP-2 (rojo) * $P < 0.05$. **C** Análisis densitométrico de cada una de las bandas de MMP-9 (azul) y de MMP-2 (rojo) * $P < 0.05$. Las flechas amarillas muestran las bandas con diferencia significativa * $P < 0.05$. El estándar de MMP-2 se muestra en el primer carril a la izquierda y el de MMP-9 humana en el carril número 5.

En el caso de los LBA de tres y cuatro meses también se observó que la banda correspondiente a la MMP-9 activa es mayor que la correspondiente a la pro-MMP-9 tanto en ratones TG como en ratones WT (figura 7 y 8). No se encontraron diferencias significativas para la MMP-9 o para la MMP-2 a los tres meses (figura 7) y a los cuatro meses (figura 8).

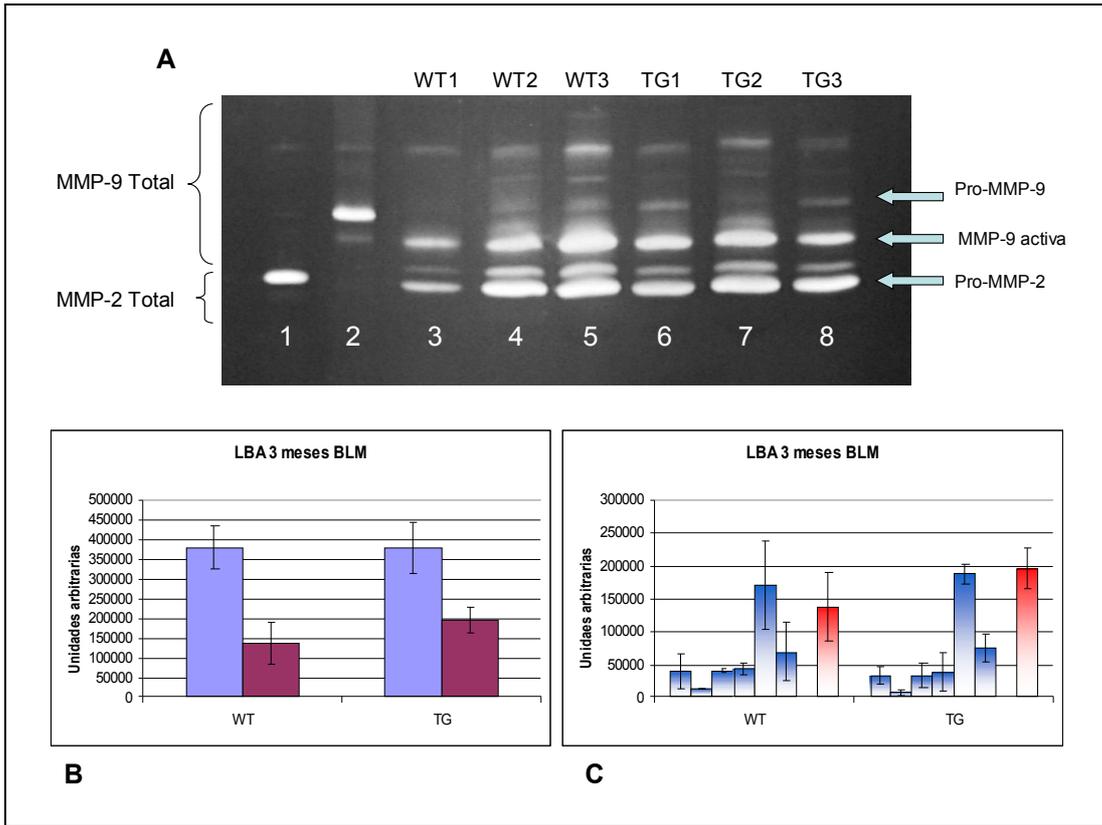


Figura 7. Zimografía de LBA de ratones 3 meses post-tratamiento. **A** Zimograma usando gelatina como sustrato. **B** Análisis densitométrico de todas las bandas de actividad correspondientes a la MMP-9 (azul), y a la MMP-2 (rojo). **C** Análisis densitométrico de cada una de las bandas de MMP-9 (azul) y de MMP-2 (rojo). El estándar de MMP-2 se muestra en el primer carril a la izquierda y el de MMP-9 humana en el carril número 2.

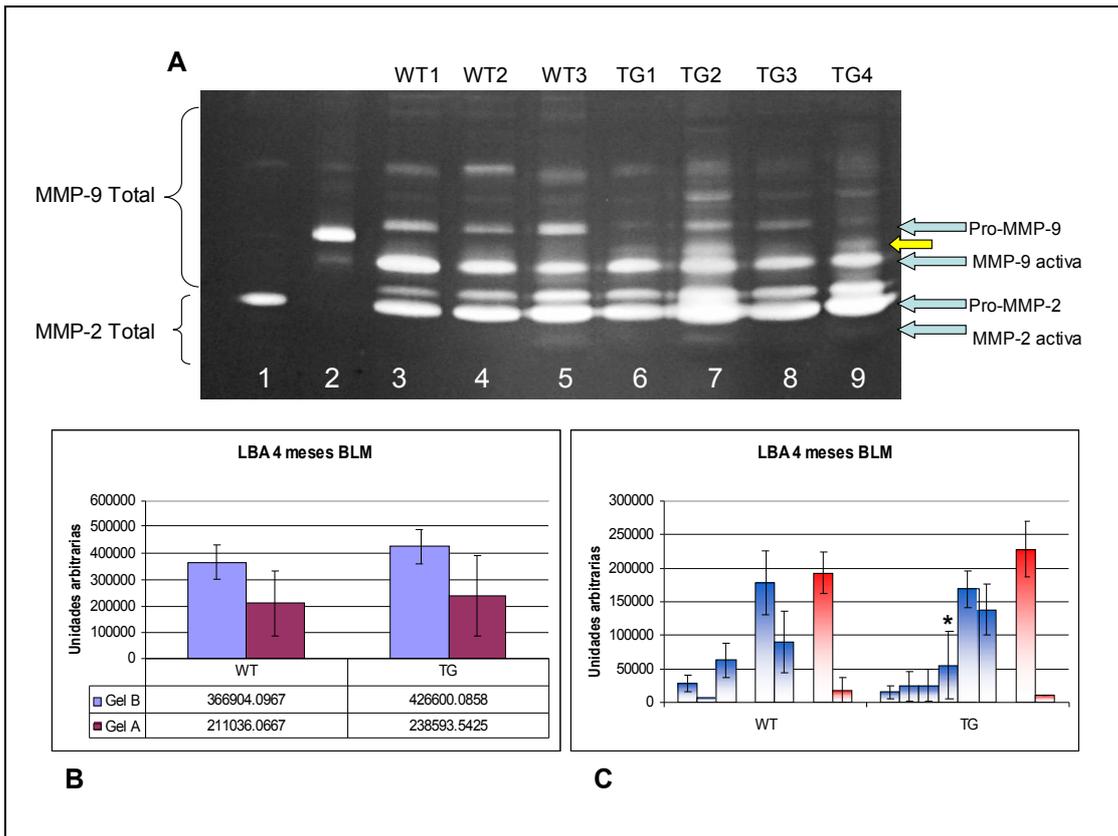


Figura 8. Zimografía de LBA de ratones 4 meses post-tratamiento. **A** Zimograma usando gelatina como sustrato. **B** Análisis densitométrico de todas las bandas de actividad correspondientes a la MMP-9 (azul), y a la MMP-2 (rojo). **C** Análisis densitométrico de cada una de las bandas de MMP-9 (azul) y de MMP-2 (rojo) * $P < 0.05$. El estándar de MMP-2 se muestra en el primer carril a la izquierda y el de MMP-9 humana en el carril número 2. La flecha amarilla muestra la banda con diferencia significativa * $P < 0.05$.

Discusión y Conclusiones

La bleomicina es una droga que se utiliza en el tratamiento de cáncer y su uso es limitado ya que causa daño a las células epiteliales alveolares y conduce al desarrollo de fibrosis pulmonar (25). En este contexto, se ha utilizado la bleomicina para el desarrollo de modelos experimentales de fibrosis pulmonar con el objeto de entender y estudiar los mecanismos moleculares de la patogénesis de esta enfermedad que no tiene un tratamiento efectivo (22, 26).

Existen numerosos estudios que demuestran que las MMP's desempeñan un papel importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar (27). En particular la MMP-9 se ha mostrado que está aumentada en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, en enfermedades intersticiales humanas que llevan a la fibrosis y en FPI (16, 22, 25-28).

Con objeto de avanzar en la comprensión del papel de la MMP-9 en la patogénesis de la fibrosis pulmonar se desarrolló un modelo experimental de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina, en ratones transgénicos que expresan la MMP-9 humana en macrófagos bajo la dirección del promotor *Scavenger receptor A* (TG) y en ratones silvestres (WT) (Cabrera S y col, manuscrito en preparación).

En el presente estudio se analizó en particular la actividad de la MMP-9 en lavados bronquio-alveolares (LBA) del mismo modelo en los ratones TG y en los ratones WT.

Nuestros resultados mostraron que en las muestras obtenidas del tejido pulmonar sin tratar, los ratones TG presentan bandas de actividad significativamente mayores que los ratones WT. Este resultado era esperable puesto que los ratones transgénicos tienen además de la MMP-9 propia de ratón, la MMP-9 humana.

Sin embargo, esta diferencia no se reflejó en los fluidos de los LBA de ratones sin tratar, lo que sugiere que en condiciones basales los macrófagos que expresan la MMP-9 humana están en el tejido pulmonar y no migran a los espacios alveolares o que la MMP-9 permanece en el interior de los macrófagos alveolares.

El análisis de la MMP-9 en los ratones TG y WT instilados con bleomicina se realizó solo en los fluidos de los LBA. La zimografía de estos lavados al igual que la de los LBA de los ratones sin tratar no mostró diferencias significativas en las formas activas y latentes de la MMP-9.

Este resultado nos lleva a proponer que el análisis de la MMP-9 por zimografía debe hacerse directamente de los pulmones de los animales tratados y/o de los botones celulares que contienen los macrófagos alveolares.

Es interesante señalar que la comparación de la actividad colagenolítica del LBA y del parénquima pulmonar de cobayos tratados con sílice mostró que no había una correlación entre ambos sugiriendo que la actividad colagenolítica en LBA no reflejaba el recambio de matriz en pulmón (29).

Adicionalmente en este estudio se encontraron diferencias en las bandas de actividad de alto peso molecular que pudieran corresponder a asociaciones de MMP-9 con otras moléculas como microglobulinas, a asociaciones multiméricas de la misma pro-MMP-9 y a variantes de ambos casos como se ha reportado (16).

En conclusión este estudio demostró que el análisis de LBA no revela diferencias en la actividad de MMP9 entre los ratones TG y WT en condiciones basales o expuestos a bleomicina y se requiere desarrollar zimografía en tejido pulmonar para demostrar si hay diferencias en la actividad de la MMP-9 entre los ratones TG y WT.

Referencias

1. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200: 448–464, 2003.
2. Pardo A, Selman M. Matriz Extracelular en: *Biología celular y molecular*, págs: 515-540. Jiménez LF y Merchant H. eds. Prentice Hall, 2003.
3. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20:33-43, 2004.
4. Alberts et al, 2002, *Molecular Biology of the Cell*, 4ª edición, Editorial Garland Science, EUA.
5. Sternlicht M. and Werb Z. How Matrixmetalloproteinases regulate cell behavior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 17: 463–516, 2001.
6. McCawley L, Matrisian L. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13: 534-540, 2001.
7. Pardo A. Metaloproteinasas de matriz extracelular, un delicado equilibrio entre daño y reparación en: *Mensaje Bioquímico*, págs: 169-180. Juárez Ma, Pardo-Vázquez JP, Del Arenal p, Cea A, Piña E. edt, XXV, 2001.
8. Folgueras A, Pendas A, Sanchez L, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 48: 411-24, 2004.
9. Reuben P, Cheung H. Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) gene expression by protein kinases. *Front Biosci* 11: 1199-1215, 2006.
10. Selman M, Pardo A. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of metallo-proteinases in Pulmonary Fibrosis. J. P. Linch ed. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Marcel Decker, Inc.* pp 451-481, 2004.
11. The American Thoracic Society and the European Respiratory Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 646-664, 2000.
12. Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Frontiers in Bioscience* 7: D1743-1761, 2002.
13. Borzone G, Moreno R, Urrea R, Meneses M, Oyarzun M, Lisboa C: Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1648-1653, 2001

14. Selman M, King T, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: progress in understanding its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134: 136-151, 2001.
15. Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic crosstalk. *Respiratory Research*, [serial online], Available from:URL: <http://respiratory-research.com/content/3/1/3> 3: 1-8, 2002.
16. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios B, 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.
17. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6292-6297, 2002.
18. Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks W, Shipley J, and Senior R, Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin, *Am. J. Pathol*, 157: 525–535, 2000.
19. Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, Dármiento JD, Selman M, Pardo A. Bleomycin-induced lung fibrosis is attenuated in transgenic mice overexpressing MMP-9. *Am J Respir Crit Care Med* 169: A856, 2004.
20. Atkinson J and Senior R, Matrix Metalloproteinase-9 in Lung Remodeling, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* Vol. 28, pp. 12–24, 2003
21. Pardo A, Barrios R, Maldonado V, Meléndez J, Pérez J, Ruiz V, Segura L, Sznajder J, Selman M. Gelatinases A and B are upregulated in lung rats by subacute hyperoxia. Pathogenetic implications. *Am. J. Pathol.* 153: 833-844, 1998.
22. Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Ramírez R, Cisneros-Lira J , Gaxiola M, Barrios R, Kala S, Lieberman M, Selman M. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 167: 925-932, 2003.
23. Cabrera S, Gaxiola M, Arreola J, Dármiento J, Selamna M, Pardo A. Bleomycin-Induced Lung Fibrosis is attenuated in transgenic Mice overexpressing MMP-9. *Am J Respir Crit Care Med* 169: A856, 2004.

24. Patricia A, Snoek-van B, and Von den Hoff J, Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *BioTechniques* 38: 73-83, 2005.
25. Adamson, Drug-induced pulmonary fibrosis, *Environ. Health Perspect.* **55**, pp. 25–36, 1984.
26. Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramos C, Selman M, Pardo A. Cigarette smoke exposure potentiates bleomycin-induced lung fibrosis in guinea pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285:L949-956, 2003
27. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc.* 3:383-388, 2006.
28. Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura-Valdez L, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Selman M. Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 161:1698-1704, 2000.
29. Montaña M, Ramos C, Pardo A, Selman M. Comparison between lung parenchyma and bronchoalveolar lavage collagenolytic activity. *Lung* 171:87-93, 1993.