

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA**

**ANALISIS DE LA EXPRESION DE METALPROTEINASAS EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE EFISEMA PULMONAR**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
DAMARIS PRISCILA ROMERO RODRIGUEZ  
JULIA SABIDO RUISANCHEZ**

**MEXICO., D.F.**

**2007**



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.

# INDICE

GLOSARIO.....	III
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.....	4
1. El aparato respiratorio.....	4
2. Enfisema pulmonar.....	5
3. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena.....	7
3.1 Tipos de colágenas.....	8
4.0 Metaloproteinasas.....	9
4.1 Tipos de metaloproteinasas.....	12
5.0 Activación de pro-MMP´s.....	15
6.0 Regulación e inhibición de MMP´s.....	16
7.0 Regulación genética.....	19
III. ANTECEDENTES.....	21
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
V. JUSTIFICACION DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	24
VI. OBJETIVOS.....	25
VII. HIPOTESIS DEL TRABAJO.....	25
VIII. METODOLOGIA.....	26
1. Desarrollo del modelo experimental.....	26
2. Obtención del material biológico.....	26
3. Histología.....	26
4. Extracción de ARN.....	27

5. Cuantificación de ARN.....	28
6. Transcripción reversa.....	28
7. Reacción en cadena de la polimerasa(PCR).....	29
8. Determinación de la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 por zimografía.....	31
9. Zimografía en geles de poliacrilamida.....	31
10. Densitometría.....	32
11. Análisis estadístico.....	32
IX. RESULTADOS.....	33
X. DISCUSION.....	47
XI. CONCLUSIONES.....	51
XII. ANEXO I Y II.....	52
XIII. APENDICE.....	53
XIV. REFERENCIAS.....	54

## **GLOSARIO.**

**$\alpha$ 1-AT:** Alfa uno antitripsina (antiproteasa)

**ADAMs:** Astacins or the disintegrin metalloproteinases

**Agentes caotrópicos:** Desnaturalizantes

**AMPc:** Monofosfato de adenosina cíclico

**AP-1:** Proteína activadora 1

**B-catenina/Tcf-4 :** Estimulante de la proliferación celular.

**Caja TATA:** Secuencia nucleotídica corta, situada de 20-30pb en 5´ del sitio de iniciación de los genes eucarióticos, a la que se une la ARN polimerasa

**CC:** Cobayos control

**cDNA:** DNA sintetizado a partir de un molde de ARN por la enzima retrotranscriptasa.

**Crossover:** Intercambio genético

**DEPC:** Dietil pirocarbonato

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNAsa:** Desoxirribonucleasa, enzima que degrada o rompe el DNA en fragmentos o en sus nucleótidos constitutivos.

**ECM:** Componentes de la matriz extracelular

**Electroforesis:** Técnica utilizada para separa una mezcla de moléculas por su migración diferencial en una fase estacionaria sometida a un campo eléctrico.

**EPOC:** Enfermedad pulmonar crónica obstructiva

**FIB-CL:** Gen FIB-CL

**HL3:** Humo leña tres meses

**HL7:** Humo leña siete meses

**MAPK:** Mitogeno activado protein cinasa

**MMP's:** Metaloproteinasas de matriz

**NF-kB:** Factor nuclear KB

**PCPE:** Procollagen C-terminal proteinase enhacer

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PKC:** Protein cinasa C

**PEA3:** Polioma aumentado unido a proteína 3

**RASI:** Pacientes con artritis reumatoide

**RECK:** Reversión-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNsa:** Enzimas que hidrolizan moléculas de ARN

**RT-PCR:** PCR retrotranscriptasa

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**SL-1:** Gen SL-1

**Sp-1:** Sitio de unión 1

**TFPI-2:** Factor inhibidor de tejido 2

**TGF $\beta$ :** Factor de necrosis tumoral  $\beta$

**TIMPs:** Inhibidores tisulares de metaloproteinasas

**TPA:** Receptor celular de esteres forbol

**TRE:** Elemento de respuesta forbol ester

**Western blot:** Método para la detección de proteínas en una muestra de un tejido homogenizado con anticuerpos específicos para la proteína.

**Zimografia:** Método utilizado para ver la actividad lítica de una proteína específica.

**zzipers:** Proteínas cierre

## 1. RESUMEN

El EPOC es una enfermedad cuya frecuencia va en aumento en forma significativa a través de la geografía mundial especialmente en los países en vías de desarrollo; clasificadas como EPOC se encuentran: la bronquitis crónica y el enfisema pulmonar. El enfisema pulmonar se puede desarrollar por diferentes causas, entre las que se encuentran el hábito del tabaquismo, medios de combustión (carbón, leña), profesión (minas de carbón, oro, cadmio, sílice), factores familiares (deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina)<sup>1</sup>.

En México se utiliza en el 17% de las viviendas la leña como medio de combustión para la preparación de alimentos, donde el mayor porcentaje se sitúa en Oaxaca con un 55% de las viviendas, seguido de Chiapas, Guerrero, Yucatán y Veracruz siendo el Distrito Federal el último lugar con un 0.20% de hogares que utilizan este medio como combustible<sup>2</sup>.

Se ha propuesto la teoría del desequilibrio proteasas-antiproteasas la cual establece que la ruptura de las paredes alveolares resulta de un daño proteolítico, que es resultante del incremento en las concentraciones de las proteinasas que degradan la matriz extracelular<sup>3</sup>.

Recientemente se investiga el papel de otras proteinasas en especial las metaloproteinasas de matriz (MMP's). En el caso del enfisema inducido por humo de leña no se ha evidenciado la participación de la Gelatinasa A y B que principalmente degradan colágena tipo IV, que es el principal componente de las membranas basales. Es por esto que el presente trabajo tiene por objetivo analizar la expresión de las metaloproteinasas de matriz MMP-2(Gelatinasa A) y MMP-9(Gelatinasa B); en un modelo de enfisema pulmonar inducido por la inhalación de humo de leña en cobayos. Siendo la elección los cobayos debido a la similitud del pulmón con la del humano; el pulmón presenta alteraciones morfológicas y fisiológicas después de la exposición al humo del cigarro<sup>4</sup>.

Se organizaron cuatro grupos con los cobayos a estudio el primero fue un grupo control, el segundo se expuso a humo de leña durante 3 meses y el

tercero fue expuesto durante 4 meses y el cuarto a 7 meses a humo de leña. Se sacrificaron los cobayos y se les realizó un lavado broquiolo-aveolar. Se extrajeron los pulmones, un pulmón se utilizó para la histología, se tiñó (hematoxilina-eosina) y se observaron las características para hacer una comparación histológica a diferentes tiempos. El otro pulmón se almacenó en nitrógeno líquido para posteriormente extraer ARN mensajero.

Posteriormente se buscó y se encontró la homología de la secuencia de los ADN complementarios de MMP-2 y 9 humanos comparando con la secuencia genómica que hasta la fecha se ha secuenciado del cobayo utilizando el software gratuito BLAST (Basic Local Alignment Search) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/tracemb.shtml>); luego se diseñaron los oligos específicos para cada secuencia de interés mediante un programa gratuito de internet llamado Primer 3 (Primer 3, [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), utilizando los tejidos congelados en nitrógeno líquido se extrajo el ARNm mediante la técnica de Trizol.

Se cuantificó el ARNm. Se realizó una RT-PCR y se obtuvo un cDNA que se pudiera amplificar para obtener así la expresión génica de cada una de las metaloproteasas realizando una PCR, y finalmente para la cuantificación una PCR en tiempo real.

Para la determinación de la actividad gelatinolítica se utilizaron los lavados broquiolo-alveolares mediante la técnica de zimografía; posteriormente se hizo una densitometría para determinar cuantitativamente los niveles de degradación de proteína generados por la MMP-2 y MMP-9.

Todos los resultados fueron analizados estadísticamente con una ANOVA y como prueba post hoc, se utilizó la prueba de Dunnett (INERST13).

Se obtuvieron como resultados:

En histología se encontraron en los tiempos de exposición alteraciones morfológicas, ya que se encontró un incremento en las células inflamatorias y



ruptura de las paredes alveolares lo que con lleva a un agrandamiento en el espacio aéreo tan característico en este padecimiento.

Dentro del análisis Bio-informático para la MMP-2 se encontró una homología del 86% para el primer segmento y del 95% para el segundo segmento. Para la MMP-9 se encontró una homología del 83% para el primer segmento y del 87% para el segundo segmento. Arrojando que esta homología es significativa. Los resultados de PCR evidenciaron la expresión de la MMP-2 con una banda a la altura de 159pb y para la MMP-9 una banda a la altura de 226 pb.

El análisis PCR en tiempo real permitió cuantificar la expresión de dichas metaloproteasas encontrándose mediante el análisis estadístico diferencia significativa para todos los tiempos de exposición comparados con los controles.

Para la determinación de la actividad gelatinolítica se evidenció su actividad con una bandas de 72Kb para la MMP-2 en todas las muestras mientras que para MMP-9 se encontró una banda de 92Kb en la muestra del mes 3.

Se concluyó por tanto en este trabajo que:

- Los niveles de expresión génica pulmonar de MMP-2 y la MMP-9 están aumentados en el desarrollo del enfisema inducido por humo de leña.
- Para la proteína MMP-2 se encontró siempre un aumento significativo en su actividad gelatinolítica, durante el desarrollo del enfisema.

## **2.0 INTRODUCCION.**

### **I. EL APARATO RESPIRATORIO.**

El sistema respiratorio es el responsable de aportar oxígeno a la sangre y expulsar los gases de desecho del organismo, de los que el dióxido de carbono es el principal constituyente. La respiración es un proceso involuntario y automático. Las estructuras superiores del sistema respiratorio están combinadas con los órganos sensoriales del olfato y el gusto (en la cavidad nasal y en la boca) siendo aquí donde el aire se calienta y humedece (desde la cavidad oral hasta la faringe). En la faringe, los órganos respiratorios especializados se bifurcan. La laringe está situada en la parte superior de la tráquea. La tráquea desciende hacia los bronquios, que se ramifican en la bifurcación traqueal, para pasar a través de los hilios de los pulmones izquierdo y derecho. Los pulmones contienen los pasillos más estrechos, o bronquiolos (alrededor de 250 000), que transportan aire a las unidades funcionales de los pulmones, los alvéolos (alrededor de 300 millones). Allí, en los miles de diminutas cámaras alveolares, se transfiere el oxígeno a través de la membrana de la pared alveolar a las células sanguíneas de los capilares. Del mismo modo, los gases de desecho se desprenden de las células sanguíneas hacia el aire en los alvéolos, para ser expelidos en la exhalación. El diafragma, un músculo grande y delgado situado debajo de los pulmones, y los músculos intercostales y abdominales son los responsables de ayudar a la respiración, contrayendo y expandiendo la cavidad torácica. Las costillas funcionan como soporte estructural de todo el conjunto torácico y las membranas pleurales ayudan a proporcionar lubricación a los órganos respiratorios de forma que no se irriten durante la respiración<sup>5</sup>.

Los bronquios y los bronquiolos son básicamente tubos con paredes musculares. Su revestimiento interno es una membrana mucosa. Las otras células que revisten los bronquios tienen tres tipos principales de receptores de superficie especializados que perciben la presencia de sustancias y estimulan la contracción y la relajación de los músculos

subyacentes. En la enfermedad pulmonar obstructiva crónica cuando ésta es causada por la bronquitis crónica, la obstrucción es parcialmente reversible, mientras que, cuando es causada por el enfisema, es irreversible<sup>6</sup>.

Las enfermedades obstructivas de la vía aérea constituyen un grupo heterogéneo de condiciones que tienen en común el estrechamiento de las vías aéreas con el consecuente aumento de la resistencia al flujo de aire y aumento del trabajo respiratorio. Estas condiciones difieren tanto en el sitio y mecanismo de la obstrucción, como en su etiología. Al conjunto de estas enfermedades se le conoce mejor como EPOC<sup>1</sup>.

EPOC se pueden clasificar<sup>7</sup>:

- Enfisema Pulmonar
- Bronquitis crónica

### **ENFISEMA PULMONAR**

El enfisema pulmonar se refiere a la destrucción de las superficies de intercambio gaseoso del pulmón (Alvéolos) pero esto describe solo uno de los cambios estructurales presentes en los pacientes con EPOC.<sup>8</sup>

El enfisema esta dividido en tres categorías<sup>9</sup>:

- Enfisema centroacinar, donde el bronquiolo respiratorio es el que esta predominantemente comprometido.
- Enfisema panacinar, donde compromete todo el acino pulmonar, se distribuye principalmente en las bases, y esta mas asociado al fenotipo homocigoto PiZZ con deficiencia congénita de  $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT).
- Enfisema acinar distal, donde compromete principalmente los conductos y sacos alveolares, especialmente alrededor de vasos, vías aéreas y pleura.

El acto de fumar produce reclutamiento de monocitos, macrófagos y neutrófilos en el pulmón a través de los factores quimiotácticos, que atraen a los leucocitos

al sitio de lesión llevando a un aumento en la liberación de elastasas. Simultáneamente, los oxidantes presentes en el humo y los producidos por los fagocitos pulmonares estimulados por el humo inactivan a proteínas del moco bronquial como tripsina, quimiotripsina, catepsina G, y a la  $\alpha$ 1-AT creando un desbalance en el sistema proteasa-antiproteasa a favor del sistema proteasa, permitiendo su acción sobre la elastina, destruyéndola<sup>10</sup>.

La ruptura de las paredes alveolares produce una disminución del área de intercambio gaseoso como puede documentarse a través de la medición de la difusión de CO, y una disminución en la retracción elástica del pulmón. La pérdida de tracción radial que las paredes alveolares normalmente ejercen sobre los bronquiolos se pierde, permitiendo un colapso mas temprano de la vía aérea durante la espiración. Esto asociado a la distalización del punto de presiones iguales produce obstrucción de la vía aérea en espiración, con el atrapamiento del aire resultante al final de la misma<sup>11</sup>.

La exposición al humo del cigarrillo produce una respuesta inflamatoria rápida con aparición de neutrófilos, sin embargo algunos fumadores desarrollan inflamación eosinofílica asociada a hiperreactividad bronquial<sup>12</sup>.

Los procesos de inflamación y reparación también juegan un papel importante en el desarrollo de enfisema, a través de la degradación de elastina alveolar. La deficiencia congénita del inhibidor de la  $\alpha$ 1-AT o la presencia de la elastasa del neutrófilo pueden llevar a enfisema pulmonar<sup>3</sup>.

Por tanto la metaloelastasa MMP-12 parece tener gran importancia en el enfisema producido por el humo de cigarrillo, generando fragmentos de elastina que a su vez produce reclutamiento de neutrófilos<sup>13</sup>.

Posiblemente la reacción inflamatoria inicial está compuesta por neutrófilos y macrófagos alveolares en todas las superficies epiteliales del pulmón. Estas células pueden con el tiempo dañar las células epiteliales y las estructuras proteicas intersticiales (elastina, colágena, proteoglicanos, etc.), que pueden ser procesadas por células dendríticas a péptidos con potencial antigénico que

podrían ser reconocidas por células T, iniciando la activación y la proliferación de estas células<sup>14</sup>.

### **3.0 LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LOS DIFERENTES TIPOS DE COLAGENA.**

El material que se encuentra fuera de las células entre los límites epitelial y endotelial de los animales multicelulares ha recibido el nombre de matriz extracelular (ECM). Esta matriz desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares, en la forma de su cuerpo y de sus órganos. Esta conformada por una gran variedad de moléculas y su composición estructural básica; comprende entre otras, las colágenas que son las responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, la elastina que le confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad, y los proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad. Así mismo, para mantener esta estructura existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz<sup>15</sup>.

La matriz extracelular está compuesta por una amplia variedad de moléculas cuyos componentes principales son: fibronectina, laminina, vitronectina, colágena tipo IV, trombospondina, elastina, ácido hialurónico, factor de von Willebrand y heparansulfato de proteoglicano<sup>16</sup>.

La colágena es la proteína más abundante en el caso de los vertebrados. En todos los órganos y tejidos del cuerpo, la colágena cumple funciones de soporte mecánico, manteniendo a las células agrupadas en unidades discretas. La distribución de esta proteína en el organismo es muy diversa, ya que constituye el principal elemento fibroso de la matriz de la piel, los huesos, los tendones, el cartílago, los vasos sanguíneos y los dientes<sup>16,17</sup>.

### 3.1 TIPOS DE COLAGENAS.

Se han encontrado hasta el momento 27 tipos.(Myllyharju,2004) Se clasifican de acuerdo a sus propiedades estructurales <sup>17</sup> :

1) Las colágenas fibrilares que se encuentran en la mayoría de los tejidos conjuntivos y que constituyen las fibras, con bandas características que se observan al microscopio electrónico (colágenas tipo I,II,III,V, XXIV y XXVII) Por ejemplo, la colágena tipo I es la proteína estructural más abundante en vertebrados y en piel tendón, ligamentos, córnea y hueso donde constituye entre el 80 y 99% de la colágena total. En el pulmón las colágenas tipo I y III se encuentran en el intersticio pulmonar, en las paredes de las vías aéreas y en los vasos sanguíneos, y junto con la colágena tipo II, que solo se localiza en el cartílago bronquial constituyen el 95% de la colágena de pulmón<sup>18</sup>.

2) Las colágenas con triple hélice interrumpida (FACIT's), asociadas a fibras que parecen conectar las fibrillas a otros elementos de la matriz; localizados en la superficie de las fibrillas (colágenas tipo IX, XII,XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII y XXVI)<sup>18</sup>

3) Las colágenas que forman redes hexagonales(colágenas tipo VIII y X)<sup>15</sup>.

4) La familia de las colágenas tipo IV componente de las membranas basales donde forma una fina red de cordeles entrelazados que atrapan a moléculas de gran tamaño como laminina o el proteoglicano heparan sulfato. Este tipo de colágena contiene el nivel más alto de carbohidratos, principalmente se encuentran en membranas basales<sup>16</sup>.

5) Colágenas tipo VI forman filamentos en rosario que pueden interactuar entre las fibras y las células<sup>15</sup>.

6) Colágena tipo VII que forman fibrillas de anclaje entre el epitelio basal y las fibras de colágena <sup>17</sup>

7) Colágenas con dominio transmembranales (colágenas tipo XIII, XVII, XXIII y XXV)<sup>17</sup>

8) Colágenas de tipo XV y XVIII, como los genes COL15A1 y COL18A1<sup>17</sup>.

9) Grupo heterogéneo de familias que comprenden un dominio de colágena con triple hélice pero no ha sido definido como colágena. Como la adiponectina, colectina, ficolina, acetil colinesterasa, receptor macrófago y ectodisplasina<sup>17</sup>.

#### **4.0 METALOPROTEINASAS.**

La interacción de las células con la ECM es crítica para el desarrollo normal y funcional de los organismos. La modulación de estas interacciones ocurre mediante la acción del único sistema proteolítico responsable de la hidrólisis de los componentes de ECM. Durante este proceso esta enzima juega un papel crucial en el control de señales, que regulan la: migración de células, invasión, proliferación y apoptosis<sup>19</sup>. Bajo condiciones fisiológicas normales la expresión de las MMP's es regulada a nivel transcripcional. Regulan varios procesos de desarrollo incluyendo embriogénesis, angiogénesis, reparación de heridas, etc. Una pérdida en el control de su actividad deriva en inflamación, artritis, aneurisma, nefritis, úlceras en los tejidos, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares (fibrosis), cáncer<sup>20</sup>.

Las MMP's son conocidas como metaloproteinasas de matriz (MMP's); inducidas por factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, interacciones célula-matriz e interacciones célula-célula<sup>20</sup>; pueden estimular la proliferación y diferenciación celular, activar hormonas y factores de crecimiento, reducir la adhesividad de las células, alterar la membrana celular, promover la migración celular o estimular la secreción y activación de otras proteinasas<sup>21</sup>.

La remodelación de la matriz extracelular normal depende de un balance de los patrones de síntesis/degradación. Las metaloproteinasas son un grupo de enzimas que regulan el balance célula-matriz<sup>19</sup>. La degradación de la matriz

extracelular involucra una familia de endopeptidasas dependientes del zinc y calcio, activadas a pH neutro. Las MMP's son un número de enzimas estructuralmente relacionadas capaces de digerir la matriz extracelular y los componentes de la membrana basal<sup>22</sup>. Las MMP's son sintetizadas como proenzimas y son procesadas a una forma activa por la eliminación de un propéptido amino-terminal<sup>21</sup>.

Las estructuras primarias comprenden varios dominios: Dominio propeptídico amino-terminal; dominio de hemopexina en el carboxilo-terminal, y un dominio catalítico<sup>23</sup>.

El dominio propeptídico consiste en aproximadamente 80-90 a.a. conteniendo un residuo de cisteína que interactúa con el zinc catalítico mediante el grupo tiol<sup>24</sup>. La estructura del prodominio para MMP-2, MMP-3 y MMP-9 consiste en 3  $\alpha$ -hélices con lazos de unión<sup>25</sup>.

El dominio catalítico (alrededor de 170 a.a) contiene la unión al Zn (HEXXHXXGXXH) y una metionina, que forma una estructura "Met-turn"<sup>20</sup>. Una base que soporta la estructura alrededor del zinc catalítico. El ligando del zinc catalítico es una molécula de agua. El ácido glutámico adyacente a la primera histidina es esencial para la catálisis. El dominio catalítico contiene dos iones de zinc y al final un ión de calcio coordinado a varios residuos. Uno de los dos iones de Zn está presente en el proceso catalítico de las MMP's. El segundo ión de Zn (también conocido como Zinc estructural) y el ión de calcio está presente en el dominio catalítico aproximadamente a 12°A del Zn catalítico; éste es esencial para que se realice la actividad proteolítica de las MMP's; los tres residuos de histidina que están coordinados con el Zn catalítico se conservan entre las MMP's<sup>25</sup>.

Tres repeticiones de fibronectina tipo II se han encontrado en los dominios de MMP-2 y MMP-9 insertados entre la quinta hebra  $\beta$  y el sitio catalítico. Las dos estructuras del dominio de fibronectina consisten en dos hojas  $\beta$  antiparalelas, conectadas por una pequeña  $\alpha$ -hélice y estabilizadas por dos uniones disulfuro<sup>25</sup>.



El dominio de hemopexina muestra gran similitud a la proteína plasmática, hemopexina. Tiene alrededor de (210 a.a), y tiene forma de disco elipsoidal; se ha demostrado que juega un papel funcional en la unión al sustrato y/o las interacciones con el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMPs)<sup>20,24</sup>. Este dominio tiene 4 hojas  $\beta$  plegadas, unidas por un puente disulfuro entre la hoja I y IV. El dominio de hemopexina de MMP-9 forma un homodímero asimétrico alrededor de la hoja IV. Dependiendo de la MMP el dominio de hemopexina es importante por la especificidad del sustrato y es requerido por pro-MMP-2 para la dimerización con MT1-MMP y la activación MMP-9<sup>25</sup>.

#### **4.1 TIPOS DE METALOPROTEINASAS.**

A la fecha se han encontrado 26 MMP's, como se puede observar en el cuadro 1 agrupadas en seis grupos. La mayoría de origen humano; aunque también se han encontrado en *Hydra*, *urchin marina* y *Arabidopsis*.

Se agrupan de la siguiente manera<sup>25</sup>: (ver cuadro 1)

#### **I. COLAGENASAS.**

MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18 (*Xenopus*) se encuentran en este grupo. Tienen la capacidad de digerir a las colágenas I,II,III a  $\frac{3}{4}$  del N-terminal. La MMP-1 degrada colágenas tipo I y II, su función corresponde al recambio normal de colágena, su actividad se incrementa para lograr la remodelación de la matriz extracelular durante la cicatrización. Mientras que la MMP-8 degrada la tipo I y modula el recambio que presenta el tejido conjuntivo durante un proceso inflamatorio. MMP-13 se expresa en diversos cánceres<sup>26</sup>.

#### **II. GELATINASAS.**

Gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9) se encuentran en éste grupo. Estas metaloproteasas tienen tres dominios repetidos de fibronectina tipo II insertadas en el dominio catalítico, que se unen a gelatinas, colágenas y laminina. MMP-2 digiere colágenas tipo I,II,III solo cuando están desnaturalizadas; rompen en un sitio específico dentro de las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del tipo de colágena I (Gly-Ileu/Leu) que genera fragmentos  $\frac{3}{4}$  y  $\frac{1}{4}$  de longitud; resultado de la hidrólisis de (Gly-Ileu/Leu). Los fragmentos de colágena

producidos son susceptibles a las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) . MMP-2 se une fuertemente a colágenas desnaturalizadas o nativas; esto mediado por 3 repeticiones de fibronectina II que se encuentran en el dominio catalítico; produciéndose así su degradación<sup>27</sup>. Este dominio conocido como dominio de fibronectina II, es único de las gelatinasas. Es por esto que estas enzimas son catalogadas en un subgrupo aparte<sup>23</sup>. Además las gelatinasas tienen gran importancia; debido a que degradan colágena tipo IV ( la principal colágena de las membranas basales) y elastina<sup>25</sup>.

### **III. ESTROMELISINAS.**

Estromelisina 1 (MMP-3) y Estromelisina 2 (MMP-10) ambas tienen especificidad por el mismo sustrato (colágenas tipo III, IV, V; gelatina, elastina, fibronectina), pero MMP-3 tiene mayor eficiencia que la MMP-10 en general. En la degradación de componentes de ECM, MMP-3 activa pro-MMP's, y esta acción es crítica para la generación de una MMP-1 activa. MMP-11 es llamada estromelisina 3, pero usualmente es agrupada en el grupo de "otras MMP's" porque la secuencia y la especificidad del sustrato divergen de aquellas de MMP-3<sup>31,28</sup>.

### **IV. MATRILISINAS.**

Estas están caracterizadas por la falta del dominio de hemopexina. MMP-7 y MMP-26 también son llamadas endometasas, y se encuentran dentro de este grupo. MMP-7 sus sustratos son: pro- $\alpha$ -defensinas, Ligando-Fas, TNF- $\alpha$  y E-cadherina; y MMP-26 también digiere un número considerable de ECM,<sup>25,28</sup>.

### **V. TIPO MEMBRANA.**

Se encuentran seis dentro de este grupo (MT-MMPs). Cuatro son proteínas transmembranales (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-24); Dos son conocidas como proteínas de anclaje (MMP-17 y MMP-25). Con la excepción de MT4-MMP todas son capaces de activar proMMP-2. Estas enzimas son capaces de digerir moléculas de ECM, MTI-MMP, adicionalmente tiene una actividad colagenolítica en colágena tipo I ,II, y III<sup>25,28</sup>.

## **VI. OTRAS MMP's**

Siete MMP's no están clasificadas. Metaloelastasa (MMP-12) es mayoritariamente expresada en macrófagos, y es esencial en la migración de macrófagos y en la degradación de la elastina. MMP-19 se identificó con la clonación de cDNA del hígado y de células T derivadas de pacientes con artritis reumatoide. Enamelisina (MMP-20) digiere la amelogenina, se ha encontrado en el esmalte dental. MMP-22 se clonó de fibroblastos de pollo; un homólogo humano, se ha identificado en una secuencia EST, sin identificar aún su función. MMP-23 expresada en órganos reproductivos; no contiene dominio de hemopexina en su lugar tiene un dominio rico en cisteína seguido por un dominio de inmunoglobulina. La última MMP hasta el momento encontrada es la MMP-28, que es expresada por los queratinocitos, se ha sugerido que se encuentra involucrada en reparación de heridas y hemostasis de los tejidos<sup>25</sup>.

## TIPO DE METALOPROTEASAS

ENZIMA	MMP	CROMOSOM A HUMANO	ESTRUCTURA EN 3D
Colagenasa Colagenasa intersticial; colagenasa 1  Neutrófilo colagenasa; colagenasa2  Colagenasa 3  Colagenasa 4 ( <i>xenopus</i> )	MMP-1  MMP-8 MMP-13 MMP-18	11q22-q23  11q21-q22 11q22.3 NA	Proteina madura; 1FBL;1CGF, 1AYK,2AYK,1HFC,1CGL,1CGL, 1CGE,966C,3AYK,4AYK Dominio cat, 1MNC,1176, 1JAO,1MMB,1JAP,1JAQ,1173,1KBC Dominio cat; 1CXV, 1FM1, 1FLS,456c,830c, 1EUB Hpx
Gelatinasas. Gelatinasa A  Gelatinasa B	MMP-2  MMP-9	16q13  20q11.2q13.1	proMMP-2, 1CK7, complejo proMMP-2-TIMP-2,1GDX; dominio cat; 1QIB, 1HOV,1EAK, dominioHpx Dominio pro-cat; 1L6J; Dominio cat; 1GKC, 1GKD, Dominio cat
Estromelisinias. Estromelisina 1  Estromelisina 2  Estromelisina 3	MMP-3  MMP-10 MMP-11	11q23  11q22.3-q23 22q11.2	Dominio cat, Islm,Dominio cat; D8M,1CIZ,1CAQ,1B8Y,2SRT,1HPS,1SLN,2 USN,1D5J,1BQO,1D7X,1D8F,1BW,UMS  1HV5
Matrilisinias Matrilisina-1 pump-1  Matrilisina 2	MMP-7  MMP-26	11q21-q22  11p15	Dominio cat, 1MMP, 1MMQ,1MMR
MMP,s tipo membrana MT1-MMP MT2-MMP  MT3-MMP  MT5-MMP GPI anchor MT4-MMP  MT6-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-24 MMP-17 MMP-25	14q11-q12 15q13-q21 8q-21 20q11.2 12q24.3 16p13.3	Dominio cat con el complejo TIMP-2; 1BOQ, 1BUV
Otras Macrofago elastasa  Sin nombre trivial  Enamelisina  XMMP  CA-MMP  CMMP  Episilina	MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-21 MMP-23 MMP-27 MMP-28	11q22-q22.3 12q14 11q22.3 ND 1p36.3 11q21.1 17q21.1	Dominio cat 1JIZ

Cuadro 1. Se muestra el nombre y abreviatura de las metaloproteasas con su ubicación cromosomal y sus características en 3D.

## 5.0 ACTIVACION DE proMMP's

Las MMP's pueden ser activadas por proteínas o *in vitro* por agentes químicos, como agentes tales como: tiol (4-aminofenilmercurioacetato,  $\text{HgCl}_2$  y N-etilmaleimida); glutatión oxidado, SDS, agentes caotrópicos y especies reactivas de oxígeno. pH alcalino y el aumento de temperatura también pueden ocasionar la activación, estos agentes trabajan principalmente alrededor de la interacción del switch de cisteína interrumpiéndolo es decir interrumpen la interacción entre un residuo de Cys y un átomo de  $\text{Zn}^{29}$ .

La activación de MMP's es escalonada en la mayoría de los casos. El ataque proteolítico inicial ocurre en la región que contiene los lazos de unión entre la primera y la segunda hélice del propéptido. La especificidad en la región anzuelo es dictaminada por la secuencia de cada MMP. Por otra parte el propéptido es removido y esto probablemente desestabiliza al resto de la proteína, incluyendo la interacción del "switch de cisteína", lo que permite un proceso intermolecular que activa parcialmente los intermediarios de MMP u otras MMP's. Así el paso final de la activación esta conducido por una MMP<sup>23</sup>. La activación más importante de proMMP-2 ocurre en la superficie celular y es mediada pro MT\_MMP's (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP y MT6-MMP<sup>25</sup>.

El mecanismo de activación para el proMMP-2 por MT1-MMP y por TIMP-2 se lleva acabo cuando la forma activa de MT1-MMP que se encuentra sobre la membrana se une a una molécula de TIMP-2 quedando inhibida la actividad de este último, así MT1-MMP puede formar dímeros o multidímeros sobre la superficie celular a través de la interacción de los dominios de hemopexina, seguido a esto proMMP-2 se une al C-terminal (sustituyendo este la unión de TIMP-2 a MT1-MMP) a través del dominio de hemopexina. Una vez que se da esta unión; la activación primaria de proMMP-2 también se da. La activación secundaria se da cuando MT1-MMP se pega a una región específica de proMMP-2 quedando parcialmente activado esta última; así la MMP-2 se

disocia de la membrana y proMMP-2 es completamente activada por un proceso intramolecular<sup>25</sup>.

## 6.0 REGULACIÓN E INHIBICIÓN DE MMP'S

La actividad catalítica de las MMP's es regulada a múltiples niveles incluyendo: transcripción, activación e inhibición. La inhibición esta dada por la familia de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas. (TIMPs). La estricta regulación de la actividad de MMP's es necesaria para mantener la homeostasis de los tejidos como también el efecto de remodelación de los tejidos<sup>20</sup>.

Los TIMPs son los principales reguladores endógenos de la actividad de MMP en el microambiente de los tejidos. Hasta el momento se han identificado cuatro TIMPs homólogos: TIMP-1,-2,-3 y-4. Se trata de glicoproteínas que se unen estrechamente a las formas activas de las MMP's, ocasionando una inhibición de su actividad<sup>20</sup>.

**TIMPs.** ( 21 A 29 kDa) tienen en su dominio un N y C-terminal, de alrededor 125 y 65 a.a respectivamente, conteniendo cada uno tres uniones disulfuro . El dominio N-terminal se encuentra en una unidad separada y es capaz de inhibir a las MMP's<sup>25</sup>.

Algunas características generales que distinguen a los TIMPs son:

Tienen la capacidad para unirse e inhibir MMP's con una estequiometria molar 1:1 , inhiben la activación auto catalítica de las MMP's latentes y la función proteolítica de las MMP's activadas, inhiben MMP's subsecuentemente después de una disociación enzima-inhibidor, requieren 12 residuos de cisteína para formar 6 uniones disulfuro y conservar su estructura de lazo u orquilla<sup>30</sup>.

Su función primaria es limitar la acción de las metaloproteinasas de matriz (MMP's) durante la remodelación tisular (Cuadro 2). Tienen la habilidad de neutralizar las colagenasas, estromelisininas, gelatinasas y las de tipo membrana. También están involucrados en la organización de reparación de una herida y forman parte fundamental para el proceso de la embriogénesis. Adicionalmente, los TIMPs pueden ser multifuncionales, intervienen en el

crecimiento celular y en el proceso de la apoptosis. A través de varios estudios como ya se mencionó se ha encontrado que los cuatro TIMPs tienen características similares, en cuanto a sus características de estructura, propiedades bioquímicas y vías de expresión, sin embargo cada uno tiene tareas específicas *in vivo* y algunos papeles pueden ser únicos para cada uno<sup>31</sup>.

TIMP-1 fue reportado por primera vez en 1975, es un glicoproteína heterogénea de un peso de 28.5kDa (Cuadro 2), con 184 residuos; TIMP-2 es considerada solo proteína por que no es glicosilado, tiene 194 residuos, pesa 21kDa y tiene carga negativa en el carbono terminal. TIMP-3 es una glicoproteína de 188 residuos con peso de 27kDa, su glicosilación se da en el N-terminal muy cerca del C-terminal. Finalmente TIMP-4 es un proteína no glicosilada, de 195 residuos y de un peso molecular de 22kDa<sup>32</sup>.

El dominio C-terminal de los TIMPs-1 y 2 interaccionan fuertemente con el dominio C-terminal de la gelatinasa B y A respectivamente resultando en la unión de TIMP-1 a la gelatinasa B y TIMP-2 a la gelatinasa A<sup>33</sup>.

Adicionalmente, las MMP's son inhibidas por TGF $\beta$ , ácido retinoico y glucocorticoides. Otra proteína que es capaz de inhibir a las metaloproteinasas es la  $\alpha$ 2-macroglobulina (glicoproteína tetramérica de 725 kDa), que funciona como un regulador de proteinasas en los fluidos corporales, es la única que inhibe casi todos las endopeptidasas a partir de la especificidad al sustrato<sup>32</sup>.

Otras proteínas tienen una modesta actividad moderadora inhibidora contra algunas MMP's, por ejemplo la proteína rica en cisteínas inductora de reversión con motivos kaszal (RECK), factores inhibidores de tejidos (TFPI-2) aunque no se ha encontrado su verdadero papel y sus mecanismos de acción<sup>32</sup>.

**INHIBIDORES TISULARES DE METALOPROTEINASAS.**

	<b>TIMP-1</b>	<b>TIMP-2</b>	<b>TIMP-3</b>	<b>TIMP-4</b>
Gen humano	Xp11.3-11.23	17q2.3-2.5	22q12.1-13.2	3p25
Proteína KDa	28	21	24	22
N-Glicosilación	Dos	Ninguna	Una	Ninguna
RNA Kb	0.9-10	3.5, 1.0	4.5(2.82.4)	1.2
Proteína	Difusible	Difusible	Unido a MEC	Difusible
Expresión in vivo	Inducible	Constitutivo	Inducible y constitutivo	Constitutivo
Inhibición por MT-MMP	No	Si	Si	Si
Ínhiben a Pro-MMP-2/9	MMP-9	MMP-2	MMP-2/9	MMP-2
Mitogenicidad	Si	Si	?	?
Apoptosis	Inhibición	Inhibición	Promoción	?

Cuadro 2. Se describen las propiedades de los TIMP's.



## **7.0 REGULACIÓN GÉNICA**

### **I. EXPRESION GENICA DE MMP´S**

La expresión de la mayoría de las MMP´s es normalmente baja en los tejidos y es inducida por la remodelación de ECM; y es regulada a nivel transcripcional en respuesta a factores de crecimiento y citocinas<sup>19</sup>.

### **II. FACTORES DE TRANSCRIPCION AP-1 Y EXPRESION GENICA.**

Los promotores de MMP´s contienen elementos cis que permiten la regulación de la expresión génica por trans-activadores incluyendo AP-1, PEA3, Sp-1,  $\beta$ -catenina/Tcf-4 y NF- $\kappa$ B<sup>34</sup>.

La composición de los promotores de MMP-2 y MMP-9 son diferentes ( Imagen 1) ya que MMP-9 contiene una caja TATA a aproximadamente -30pb (relativos al sitio de inicio de transcripción) y un sitio de unión AP-1 a -70 pb. La mayoría de estos promotores contiene corriente arriba un sitio de unión PEA3 que se encuentra adyacente al promotor y coopera con el sitio de unión AP-1. Mientras que la MMP-2 no contiene una caja TATA (Imagen 1) ; la transcripción de estos promotores puede iniciar en diferentes sitios. La expresión esta determinada por la familia de los factores de transcripción Sp-1, que se unen a una caja proximal. Su expresión es constitutiva, con una pequeña inducción de factores de crecimiento o citocinas<sup>35</sup>.

Una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento incluyendo interleucinas, interferones, EGF, KGF, NGF, HGF, bFGF, VEGF, PDGF, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  que disparan la señalización celular culminando en una trans-activación de promotores MMP por la convergencia en AP1 y/o PEA3. A continuación se muestra la composición de los promotores tanto de la MMP-2 y MMP-9<sup>34</sup>. Ver Imagen 1.

## PROMOTORES DE MMP-9 Y MMP-2

### MMP-9



### MMP-2

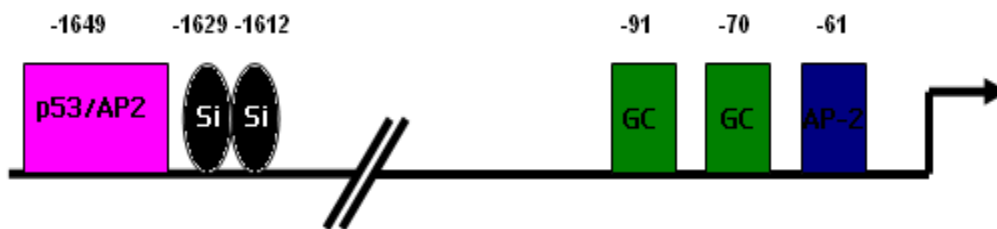


Imagen 1. Muestra la ubicación de cada uno de los elementos de el promotor

### III. ANTECEDENTES.

Entre las enfermedades pulmonares que son causa frecuente de morbilidad y mortalidad se encuentran las agrupadas como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); en esta categoría se incluye al enfisema pulmonar y la bronquitis crónica.<sup>36</sup>

El factor de riesgo más importante para el desarrollo de EPOC y especialmente de enfisema es el hábito del tabaquismo. Otro factor que se ha asociado de manera importante en el desarrollo de esta enfermedad es la exposición doméstica al humo de leña muy frecuente en los países en desarrollo, ya que se ha estimado que alrededor del 50 % de la población en el ámbito mundial utiliza la madera (ó leña) como una de las principales fuentes de energía, entre otras actividades para la elaboración de sus alimentos.<sup>37,38</sup>

En 1965 Gross describió el primer modelo animal reproducible de enfisema pulmonar, instilando intra-traquealmente papaína en ratas.<sup>39</sup> Estudios subsecuentes en una variedad de animales demostraron que las enzimas capaces de solubilizar los CME producían lesiones enfisematosas; éstas observaciones dieron como resultado el desarrollo de la teoría de deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina, sustentando la hipótesis de el balance proteasa-antiproteasa<sup>40</sup>; la cual establece que la ruptura de paredes alveolares resulta de un daño proteolítico causado por el incremento en las concentraciones de las proteinasas que degradan la matriz extracelular, acompañado de un decremento en los niveles de sus inhibidores. Las enzimas a las que fundamentalmente se refería esta teoría son las elastasas, y en especial las sintetizadas por los neutrófilos y macrófagos; y de los inhibidores como la  $\alpha$ -1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT)<sup>3</sup>.

Se desarrollaron otros modelos animales que incluían ratones, perros, monos y con el advenimiento de la ingeniería genética se utilizaron roedores genéticamente deficientes (knockout) de MMP-12 sugiriéndose el papel de esta metaloproteinasa en el desarrollo del enfisema pulmonar.<sup>41</sup>

Las metaloproteinasas de matriz (MMP's), metaloenzimas dependientes de Calcio y Zinc que degradan los diversos componentes de la matriz extracelular, incluyendo a las fibras elásticas<sup>4</sup>. Entre estas MMP's se encuentran las colagenasas y las gelatinasas, y en este sentido la participación de las metaloproteinasas de matriz (MMP's) ha sido claramente sustentada<sup>4</sup>. Además, otros estudios sugieren que la gelatinasa B (MMP-9), la gelatinasa A (MMP-2)<sup>42, 43</sup>.

En el caso del enfisema inducido por humo de leña no se ha evidenciado la participación de estas MMP's dentro del contexto del su proceso patogénico, tal como ocurre en el caso del enfisema por humo de tabaco. Este hecho, sugiere la necesidad de contar con un modelo experimental, que simule las características del enfisema pulmonar humano producido por la exposición al humo de leña, con el cual se puedan desarrollar estudios que nos permitan evaluar el proceso patogénico de la enfermedad, así como la participación y expresión de la gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9).

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

El enfisema pulmonar es un padecimiento frecuente en nuestro país principalmente en las zonas rurales donde se utiliza la leña como combustible en espacios mal ventilados, donde la gente se somete a la inhalación del humo, e igualmente puede ser observada en pacientes que han laborado durante años con materiales que contienen polvos inorgánicos como sílice o carbón o ambas; en los cuales se va desarrollando un padecimiento que es crónico, incapacitante, progresivo y con una calidad de vida muy deteriorada que conlleva finalmente a la muerte. No son conocidas las variables patogénicas de la enfermedad pero se supone que el tiempo, la intensidad y el inicio a temprana edad de la exposición, determinan un papel preponderante en su desarrollo aunado al hecho de que el diagnóstico se lleva a cabo en etapas avanzadas.

Esta es la importancia de estudiar los procesos patológicos en modelos animales que permitan evaluar los mecanismos patogénicos del enfisema, lo cual en un futuro permitirá desarrollar estrategias terapéuticas que ofrezcan una mejor calidad de vida al paciente.

## V. JUSTIFICACIÓN DEL MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

El cobayo se está utilizando específicamente en el estudio del parénquima pulmonar, examinando la evidencia de la destrucción enfisematosa, aunque también algunos estudios se han enfocado a los efectos del humo en las vías aéreas<sup>44</sup>.

La estructura del pulmón de cobayo es análoga a la humana con tres lóbulos mayores en el pulmón derecho y dos en el pulmón izquierdo. Aunque el cobayo, no tiene bronquiolos verdaderos, que correspondan al secundario y al terciario humano, tiene bronquiolos terminales y bien definidos conductos alveolares<sup>29</sup>.

El pulmón presenta alteraciones morfológicas y fisiológicas después de la exposición al humo de cigarro, a las mismas concentraciones que los humanos. Con respecto a secuencias de genes y proteínas se tiene muy poca información, pero se pueden determinar la homología de secuencias de ADN de cobayos y humanos para diseñar oligonucleótidos que nos permitan por ejemplo medir la expresión génica de algún determinado gen<sup>45</sup>.

## **VI. OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Analizar la expresión génica y proteolítica de las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9; en un modelo de enfisema pulmonar inducido con la inhalación de humo de leña en cobayos.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Desarrollar el modelo animal experimental de enfisema pulmonar en cobayos inducido por la exposición a humo de leña.
- Corroborar por histología el daño pulmonar inducido por el humo de leña en los cobayos expuestos comparado con los animales control.
- Evaluar los niveles de expresión génica de las MMP-2 y MMP-9 en los tejidos pulmonares, mediante la técnica de PCR en tiempo real.
- Evaluar la actividad gelatinolítica de MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B) en lavados bronquioloalveolares (LBA) en ambos grupos de animales mediante zimografía.

## **VII. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

El desarrollo del enfisema provocado por humo de leña en cobayos estará asociado con el incremento de los niveles de expresión pulmonar de MMP-2 y MMP-9.

## **VIII. METODOLOGÍA.**

### **1. DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL.**

Se utilizaron 24 cobayos con dos meses de edad; hembra, los cuales fueron divididos en 4 grupos: control, exposición a 3 meses, exposición a 4 meses y exposición a 7 meses a humo de leña.

El modelo experimental consistió en exponer a los animales colocados dentro de una cámara de acrílico mezclando aire ambiente circulante con el humo producido por la combustión de 60 g de madera, durante tres periodos de 30 minutos por día; alternados por periodos de 30 minutos en los que solo se recirculará aire ambiente circulante; esto fue por cinco días a la semana. Se determinó mediante un detector que el nivel de CO y de partículas suspendidas no excediera 100 ppm.

### **2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.**

El material biológico fue obtenido al sacrificar a los cobayos por una sobredosis de pentobarbital sódico, obteniéndose los pulmones a los tres meses, cuatro meses y siete meses cada uno con su correspondiente grupo control.

El lavado bronquiolo-alveolar (BAL), se obtuvo de la siguiente manera, los pulmones se lavaron tres veces con 8 mL. de solución salina a 37 °C, por vía intratraqueal. Aproximadamente del 70-80% del instilado se recuperó por cada una de las muestras.

### **3. HISTOLOGIA.**

El pulmón izquierdo se perfundió con formaldehído al 4%. Los pulmones una vez fijados, fueron procesados con las técnicas convencionales para microscopía de luz, y se realizaron tinciones de hematoxilina/eosina, además se valoró el área con lesiones, la inflamación, la presencia de sacos aéreos y la presencia de clavos de ruptura.



Los pulmones fueron instilados con paraformaldehído al 4 % en PBS a 20 cm de H<sub>2</sub>O de presión constante y posteriormente se continuó la fijación por 2 horas en la misma solución para terminar con tres lavados de 15 minutos en PBS. Los tejidos se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol 30, 50, 70, 80, y 96 % y finalmente en etanol absoluto, 30 min encada paso, luego en xilol por 30 min , y finalmente se incluyeron en parafina. Se utilizaron cortes de 3 µm los cuales se tiñeron con hematoxilina/eosina.

Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina, posteriormente se colocaron en una solución de eosina al 2 % por siete minutos, luego se colocaron en alcohol absoluto por 15 min y se observaron al microscopio.

#### **4. EXTRACCION DE ARN.**

El pulmón derecho se utilizó para la extracción del ARN total con el método de TRIZOL (Life Technologies)

1. Homogenización: Al tejido del pulmón se le adicionó 1 mL de Trizol por cada 50-100 mg de peso de tejido y se homogenizó con el Polytron Brikman. Una vez homogenizado se filtró con una gasa para quitar los restos de tejido, el filtrado se recupero en un tubo corex.

2. Separación de la fase acuosa: El filtrado se incubó por 5 min a una temperatura de 25 °C para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se añadió 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol agregado. Se agitaron los tubos vigorosamente 15 segundos y se incubaron una temperatura de 25 °C por 2 minutos y se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos. A una temperatura de 4°C.

3. Precipitación del ARN: Al término de la centrifugación se recuperó la fase acuosa en otro tubo, y se adicionó 0.5 mL de isopropanol por cada mL de Trizol agregado y se dejó precipitando a una temperatura de 25 °C por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g, por 10min, a 4 °C.

4. Lavado de ARN: Después de la centrifugación se decantó el sobrenadante y al precipitado se le adiciono 1 mL de etanol al 75% por cada mL de Trizol agregado. Nuevamente se centrifugaron las muestras a 7,500 g, por 5 min a 4°C. Al finalizar el procedimiento se decanto el sobrenadante y se dejó secar el

tubo con el ARN extraído al medio ambiente y finalmente se resuspendió el ARN en 50  $\mu$ l de agua DEPC (dietil pirocarbonato).

## **5. CUANTIFICACION DE ARN.**

Se cuantificó el ARN por espectrofotometría (Perkin Elmer MBA2000) para obtener la concentración y la calidad del ARN. La longitud de onda a la que se cuantificó el RNA fue de 260 nm, y luego se determinó la absorbancia a 280 nm y se obtuvo una proporción entre la relación 260/280 nm; el parámetro para decir que hubo una pureza adecuada fue obtener valores entre 1.7 y 2.

## **6. TRANSCRIPCION REVERSA. (RT)**

Una vez obtenida la concentración se ajustaron las concentraciones a 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Posteriormente se realizó la transcripción reversa con el Kit Clontech BD Biosciences, Advantage RT-PCR-Kit. Se prepararon los tubos de reacción de la siguiente manera: A 1  $\mu$ g ARN se le agregó un 1  $\mu$ l de DNAsa, 1  $\mu$ l de amortiguador de reacción 10X, y se aforó a 10  $\mu$ l con agua DEPC. Los tubos se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente para degradar al DNA genómico que pueda estar de contaminante. Posteriormente, se agregó 1  $\mu$ L de EDTA y se incubó 10 minutos a 65 °C, para inactivar la DNAsa. Enseguida se procedió a realizar la reacción de transcripción reversa. A cada reacción se le agregó 1  $\mu$ L de hexámeros (2.5  $\mu$ M) y se incubó 2 minutos a 70 °C, para que los hexámeros hibridaran con el ARN templado, se incubó inmediatamente en hielo y se agregaron 8  $\mu$ l una mezcla de amortiguador (KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, y Tris-HCl 50 mM, pH 8.3), 20 pmol de hexámeros iniciadores, una mezcla de nucleótidos de concentración 10 mM de cada uno (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 20 unidades de inhibidor de RNAsas recombinante y 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa (Moloney-Murine Leukemia Virus reverse transcriptase) y llevará a 20  $\mu$ l de solución final con H<sub>2</sub>O-DEPC

Se incubó a una temperatura de 42 °C, durante una hora, y finalmente se desnaturalizó la enzima transcriptasa reversa a una temperatura de 94 °C, por 5 min.

## 7. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

En este ensayo se utilizó el cDNA que obtuvimos de la RT-PCR del ARN que extrajimos del pulmón de cobayo expuestos a humo de leña en los periodos señalados así como el grupo control para identificar la expresión de la MMP-2 y MMP-9 con oligonucleótidos específicos .

Para MMP-2 se utilizaron oligonucleótidos específicos para MMP-2 (Tabla 1) humana cuya secuencia del fragmento amplificado se observó que tuvo una homología del 86% para el primer fragmento y del 95 % para el segundo fragmento cuando se comparó con las secuencias del genoma del cobayo; esta comparación se realizó con el software de uso gratuito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/tracemb.shtml>. Ver resultados en bioinformática.

Para MMP-9 también se emplearon oligos específicos para cDNA humano (tabla 1) y se analizaron como para MMP-2. La homología fue de 83% para el primer fragmento y del 87% para el segundo fragmento. Una vez obtenidas las secuencias homólogas se realizó el diseño de oligos (Primer 3, [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) con respecto a estas; para el posterior ensayo de PCR en tiempo real.

El ARN ribosomal 18s (Tabla 1) se utilizó para normalizar los resultados de la expresión de la MMP-2 y MMP-9.

### SECUENCIA DE PRIMERS

GEN	SECUENCIA OLIGO SENTIDO	SECUENCIA OLIGO ANTISENIDO	T.A.	T.P.
MMP-2	5'agggcgctctgtcct3'	5'ggtcctctcgacgttgga3'	56°C	159pb
MMP-9	5'agcactttgggaggccaagg3'	5'ggtgacgtgaggtcggaccc3'	57°C	226pb
ARN18s	5'cgttgattaagtcctgcctt 3'	5'tcaagttcgaccgttctcag3'	60°C	142pb

T.A..- TEMPERATURA DE ALINEACION. T.P.- TAMAÑO DEL PRODUCTO

**Tabla1.** Muestra la secuencia de cada uno de los primers utilizados, así como el ARN ribosomal

La reacción de PCR se llevó acabo usando 3 µl cDNA o 1 µl del estándar (que abajo se describe), 20 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, una mezcla de nucleótidos 200 µM de cada uno, 10 picomoles de cada

iniciador específico, fluoresceína 10 mM, 2.5  $\mu$ l Syber Green 10X y 1.25 unidades de la enzima Amplitaq (Invitrogen).

Se construyó una curva estándar para cada gen con cada producto específico de PCR, lo cual se realizó de la siguiente manera: se amplificó con los iniciadores específicos de cada gen de interés, los productos se separaron en geles de agarosa al 1.5%, y las bandas específicas fueron cortadas del gel y se purificarán con el estuche de *Quiagen II gel extraction* (Quiagen, Valencia, CA). Después, con el producto purificado se hicieron diluciones seriales desde  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^2$  número de copias (ver anexo 1); tanto los estándares como los cDNAs fueron amplificados por triplicado. Las ecuaciones de las curvas estándar se calcularon refiriéndose al ciclo umbral (Ct), el cual está definido como el ciclo; en el cual todas las muestras están en la fase de amplificación exponencial; este ciclo umbral se graficó *versus* el logaritmo base 10 ( $\log_{10}$ ) del número de copias de cada estándar, obteniéndose la pendiente de la recta (m) y la ordenada al origen (b) de la curva estándar la cual está definida como:  $x=(y-b)/m$  es decir  $\log_{10}$  número de copias=(Ct-b)/m, y el número de copias de cada muestra problema. Los resultados se expresaron como el número de copias de cada gen normalizado con el número de copias del ARN ribosomal 18s (Fig 5a y 5b).

Las condiciones para la amplificación para MMP-2 y 9 fueron llevadas a cabo utilizando el siguiente protocolo: 94 °C/2 min.; 40 ciclos de 3 pasos cada uno: desnaturalización a 94 °C/30 s, alineamiento de iniciadores a 56°C/30s y un paso de extensión a 72 °C/45 s. Para ARN 18s la temperatura de alineamiento fue de 60 °C. Después de esto se corrió un protocolo para confirmar amplificación específica denominado curva de fusión (melt curve)(Fig 5c), el cual consistió en un paso inicial a 95 °C/15 s, un segundo paso a 60 °C/20 s y por último un incremento de 0.5 °C cada 10 s de 60 °C a 95 °C, con monitoreo de la fluorescencia; la especificidad fue confirmada por la presencia de un solo pico en las gráficas correspondientes. Adicionalmente los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5%, para verificar el tamaño de los productos amplificados.

## **8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINOLITICA DE MMP-2 y MMP-9 POR ZIMOGRAFIA**

Se utilizaron lavados bronquioloalveolares para evaluar la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 . Se utilizaron geles de poliacrilamida al 8% que contienen 1 mg/mL de gelatina. Previamente se hizo una cuantificación de proteínas por el método de Bradford para posteriormente cargar en el gel de poliacrilamida 8 µg de proteína.

La cuantificación se realizó de la siguiente manera

1. Se hizo una curva de referencia con albúmina a una concentración de 1 µg/mL en PBS, la curva tuvo las siguientes concentraciones : 1 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg y como blanco se utilizó PBS.
2. Se ajustó el volumen con PBS a 800 µl.
3. Se adicionó 200 µL del reactivo de Bradford para completar un volumen total de 1mL.
4. La curva, se cuantificó en el espectrofotómetro Beckman DU640.
5. En la curva patrón, se interpolaron los valores registrados de los lavados y se obtienen la concentración de cada muestra.

## **9. ZIMOGRAFÍA EN GELES DE POLIACARILAMIDA. (Gel de acrilamida/gelatina).**

Para la preparación de los geles de poliacrilamida, se comenzó por el gel inferior al 8%, se colocó en un vaso de pp de 150 mL: 3.64 mL de agua desionizada, 1 mL de gelatina, 2.5 mL de tris al 1.5 M con un pH de 8.8, 100 µl de SDS al 10%, 2.66 mL de acrilamida, 50µl de PSA al 20% y finalmente 10 µl de TEMED. Se colocó en la cámara de electroforesis y se esperó a que gelificara; una vez gelificado se preparó el gel superior al 4%.

En un vaso de pp de 150 mL se colocó con 3 mL de agua desionizada, 1.24 mL de tris 0.5 M, 100 µl de SDS al 10%, 660 µl de acrilamida, 50 µl de PSA, y finalmente 10 µl de TEMED. Se vertió el gel superior, se colocaron los peines, y se esperó a que gelificara.

Una vez gelificado se retiraron los peines, los geles se colocaron en la cámara y se agregó amortiguador de corrida 1x, para poder cargar los pozos con 8  $\mu\text{g}$  de proteína. Una vez que se cargo el gel con 8  $\mu\text{g}$  de cada muestra se siguieron los siguientes pasos:

1. El gel se corrió a 200 volts y en frío (4 °C).
2. Se retiró el gel de la cámara y de la placa de vidrio se lavo dos veces con 50 mL de Triton 2.5% durante 30 min. En agitación y temperatura constante.
3. Se retiró el Triton y se adicionaron 100 mL de buffer de incubación y se dejo incubando 24 horas a 37°C.
4. Se retiró el buffer de incubación y se adicionaron 30 mL de solución teñidora con agitación por una hora.
5. Se retiró la solución teñidora y se adiciono 30 mL de solución desteñidora por una hora y después se observo el gel al UV observándose las bandas que evidenciaban la actividad gelatinolitica.

## **10. DENSITOMETRIA.**

Para la determinación cuantitativa de los niveles de degradación de proteína generados por MMP-2 y MMP-9 se realizó una densitometría de las bandas que mostraban actividad gelatinolitica.

El propósito fue analizar si existe una diferencia significativa entre la degradación de las proteínas de los LBA control comparados contra los LBA experimentales.

## **11. ANALISIS ESTADISTICO.**

Para el análisis estadístico se utilizó el método estadístico ANOVA y como prueba post hoc, se utilizó la prueba de Dunnett (INERST13) considerándose significativo una  $p < 0.05$

## **IX. RESULTADOS.**

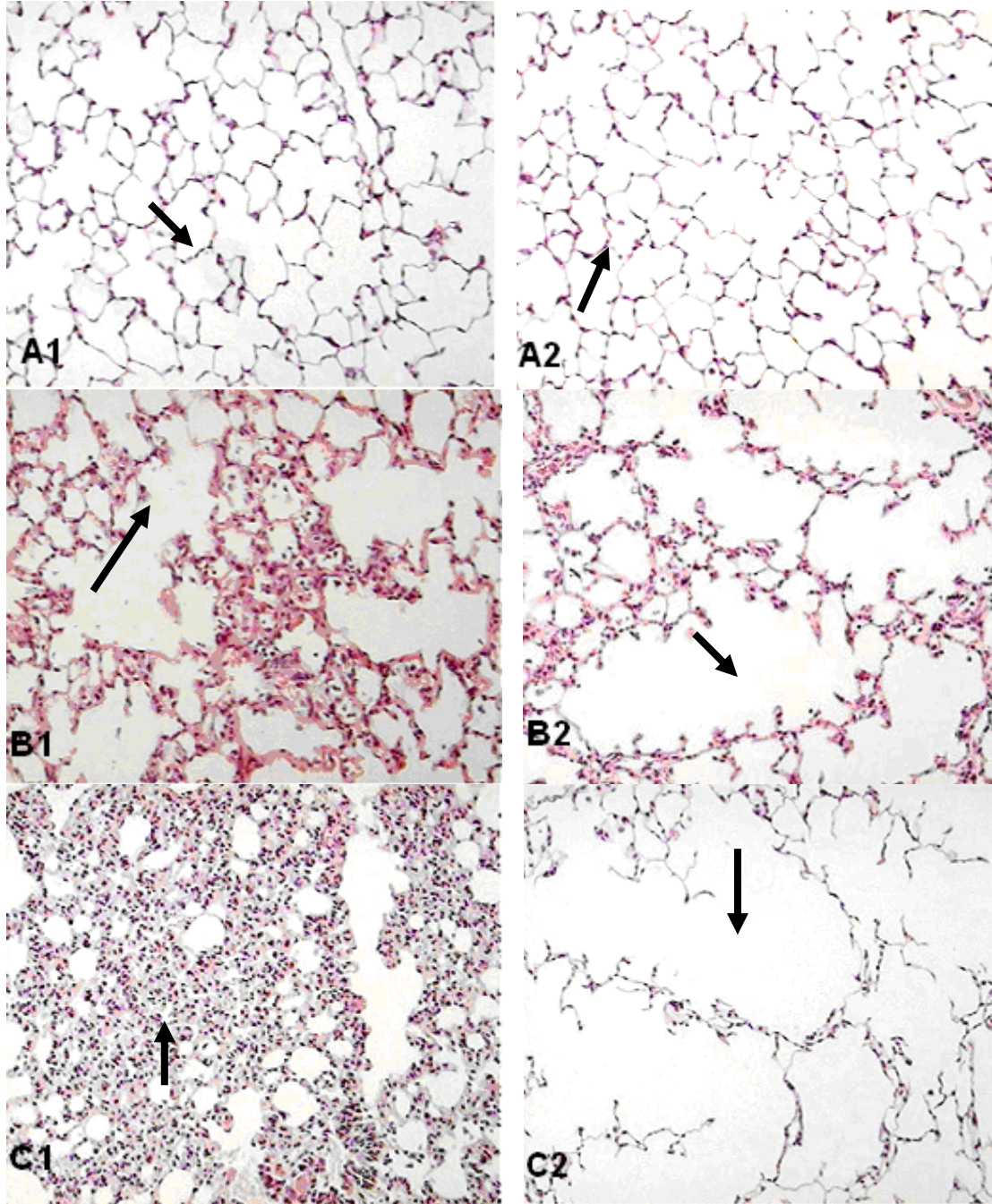
### **HISTOLOGÍA.**

Se realizó el análisis histológico, con diferentes aumentos en el microscopio(10x y 25x), observándose en la Fig 1 las lesiones enfisematosas; mientras que en la Fig 2 se observó un campo general de las lesiones.

En la figura 2 (A1 y A2) se observó las paredes alveolares delineadas, así como los sacos alveolares y conductos respiratorios en condiciones normales sin encontrarse inflamación. En la figura 1 (B1 y B2) las muestras se obtuvieron al cuarto mes de exposición a humo-leña, se observó inflamación importante en las paredes alveolares, así como la ruptura de estas, los sacos alveolares pierden su forma haciéndose evidente el alargamiento del espacio alveolar siendo estas las lesiones enfisematosas. En la figura 1 (C1 y C2) las muestras fueron obtenidas al séptimo mes de exposición a humo-leña; los sacos alveolares son escasos, la inflamación peribronquial, alveolar e intersticial es evidente.

En la figura 2 se pudo observar (1) la histología normal de pulmón obtenidos de pulmón de cobayo. Se observaron sacos alveolares delineados, bronquiolos respiratorios y los conductos alveolares, así como sus paredes sin alteración alguna o algún tipo de inflamación. A diferencia de (2) donde son muestras obtenidas al séptimo mes de exposición a humo-leña donde es evidente el alargamiento del espacio aéreo así como la ruptura de las paredes alveolares.

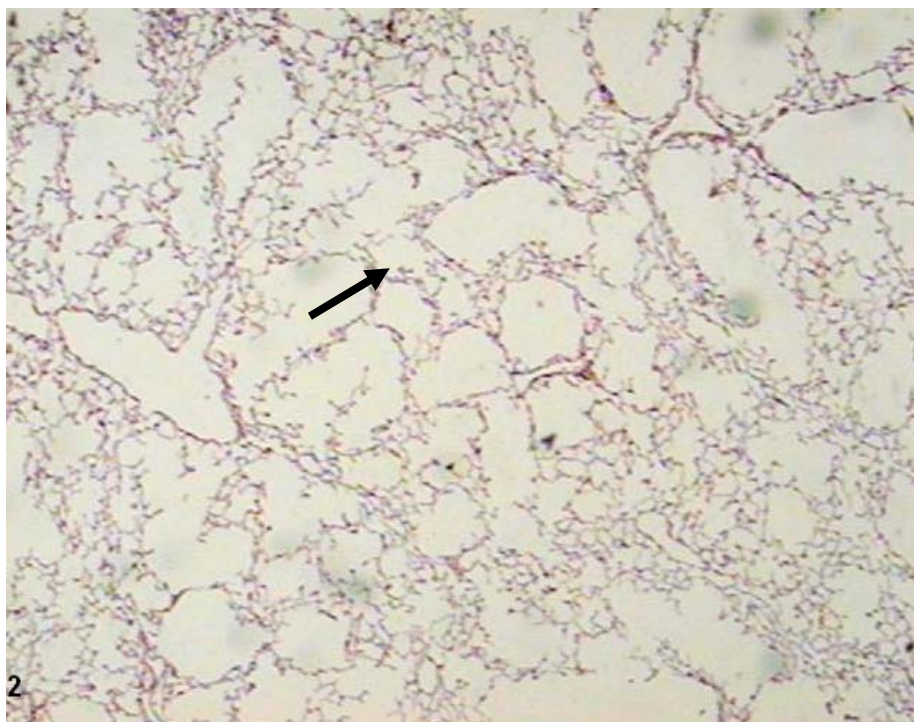
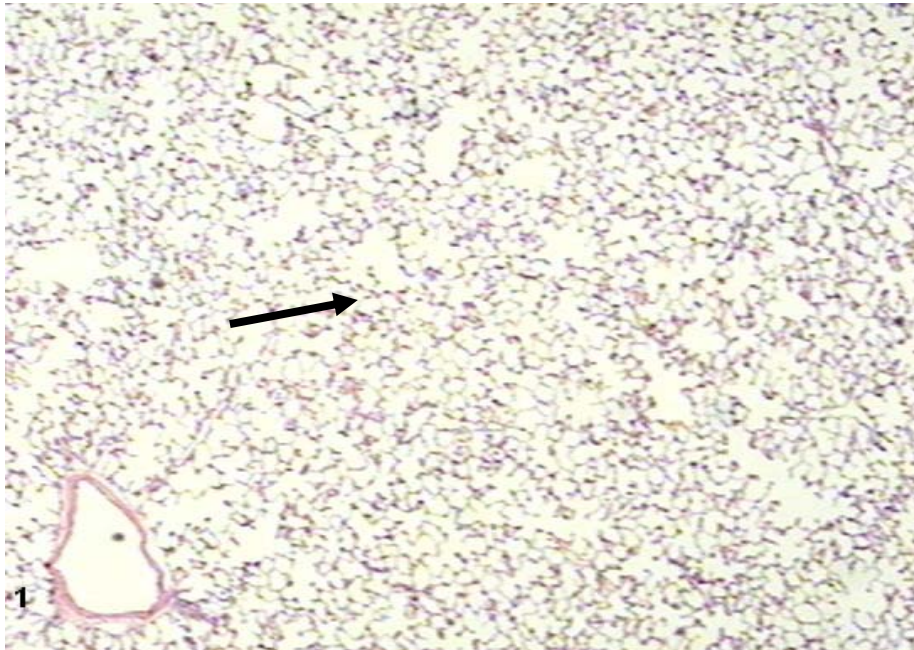
## COMPARACIONES HISTOLÓGICAS A DIFERENTES TIEMPOS CONTRA EL GRUPO CONTROL



**Figura 1.** Arriba (A1 y A2). Histología normal de pulmón (ver las flechas para todas las fig). (B1). Expuesto a humo-leña durante 4 meses; se observa inflamación peribronquial, intersticial e intraalveolar con áreas de ruptura de la pared alveolar. (B2) Expuesta a humo-leña durante 4 meses se observa ruptura de paredes alveolares, en comparación con la C, tiene un menor daño (C1). Expuesto a humo-leña durante 7 meses se observa una inflamación importante (C2). Expuesto a humo-leña durante 7 meses se observa claramente el daño a las paredes alveolares así como su ruptura. (Todas las muestras se tiñeron con hematoxilina/eosina)10x.



## HISTOLOGIA DE PULMON NORMAL CONTRA EXPOSICIÓN A 7 MESES



**Figura 2. (1).** Pulmón normal no se observan alteraciones (2) Expuesto a humo-leña durante 7 meses, se observa claramente la ruptura de las paredes alveolares y el alargamiento del espacio aéreo.(Todas las muestras se tiñeron con hematoxilina/eosina)25x.

## BIOINFORMATICA

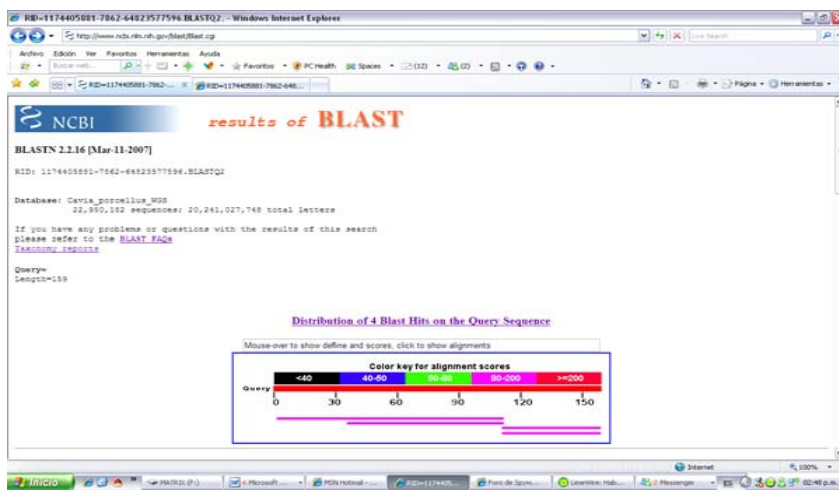
Para determinar la homología que hay entre la secuencia del genoma del cobayo y la secuencia de nucleótidos de las MMP's humanas se utilizó un programa informático disponible en Internet, en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> .BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en donde se compara secuencias determinadas contra genes previamente caracterizados.

Este método se basa en modelos estadísticos en la similitud de los pares de secuencias, para cuantificar los parecidos se determina una puntuación de alineamiento entre las dos secuencias. Esta puntuación se obtiene consultando una matriz de sustitución en la que está representado, mediante un valor numérico, la frecuencia con que se observan los posibles cambios entre aminoácidos o la frecuencia con que éstos se conservan. BLAST aplica un marco estadístico (basado en un modelo aleatorio que describe cómo se distribuyen las puntuaciones de semejanzas al azar y qué parámetros afectan a esta distribución) para determinar cuán significativa es una determinada puntuación dadas las características de la secuencia problema, de la base de datos y de la matriz de sustitución, y proporciona un e-value (valor esperado) que indica, para cada puntuación, cuántas veces esperaríamos que por azar apareciese esa determinada puntuación o una mejor en la base de datos utilizada.<sup>46</sup>,<sup>47</sup>(Figura 3 y 4).

En este caso se hicieron dos comparaciones una para MMP-2 y otra para MMP-9, encontrándose lo siguiente: Para MMP-2. Se encontraron dos segmentos homólogos representativos, donde el primer segmento tiene una homología del 86% y del 95% para el segundo segmento (Figura 3). Esto demuestra una identidad significativa entre el cobayo y el humano. Por otra parte la MMP-9 arrojó dos segmentos representativos en donde se encontró una homología en el primer segmento de 83% y para el segundo de 87%, interpretándose como una homología significativa(Figura 4).

## ANALISIS BIO-INFORMATICO

### MMP-2



**FIGURA 3.** Pagina de internet con los resultados del blast mostrando la homología entre la secuencia de la MMP-2 human y la secuencia del *cavia porcellus*.

Secuencias de cada segmento mostrando su homología que en este caso es de el 86% para el primer segmento y 95% para el segundo.

```
>gnl|ti|816749755 G732P626661RG3.T0
Length=965
Get TBLASTX alignments
```

```
Score = 125 bits (65), Expect = 4e-26
Identities = 95/110 (86%), Gaps = 0/110 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 3
GGGCGCTCTGTCTCCTGGGCTGCCTGCTGAGCCACGCCCGCCGCCGTCGCCCATCA
62
```

```
|||||
|||||
Sbjct 504
GGGCTCTCTGTCTCCTGAGCTGCTTGTGCTCCGCGCTGCCCGCCGCCATCGCCCATCA
445
```

```
Query 63
TCAAGTTCCTCCCGCGATGTGCCCCAAAACGGACAAAGAGTTGGCAGTG 112
```

```
|||||
Sbjct 444
TCAAGTTCCTCCCGCGATGTGGCTCCAAAACGGACAAAGAGCTGGCGGTG 395
```

```
>gnl|ti|1646476025 G732P51827FC23.T0
Length=825
Get TBLASTX alignments
```

```
Score = 81.4 bits (42), Expect = 8e-13
Identities = 46/48 (95%), Gaps = 0/48 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 112 GCAATACCTGAACACCTTCTATGGCTGCCCAAGGAGAGCTGCAACCT
159
```

```
|||||
Sbjct 212 GCAATACCTGAACACCTTCTATGGCTGTCCCAAGGATAGCTGCAACCT
165
```



## **CUANTIFICACION DE LA EXPRESION GÉNICA PARA METALOPROTEINASAS DE MATRIZ (MMP'S) POR PCR EN TIEMPO REAL.**

Como se puede observar en la figura 5 se muestra el resultado de análisis de PCR en tiempo real. La figura 5a nos muestra la amplificación de rRNA 18s detectado con los cambios de fluorescencia. Se ensayaron 9 muestras por triplicado y 5 cDNAs estándar, cada línea representa a una muestra. La figura 5b muestra el melt-curve (curva de disociación) de cada uno de los amplicones mostrados en la figura 5c, observándose la amplificación de cada producto específico. En la figura 5c se observa que la reacción es lineal en las nueve muestras representativas, a partir de la concentración de estándares de cDNA en el comienzo. Se obtuvo una eficiencia del 101.6%, y el coeficiente de correlación de las curvas estándar fue de 1.000

En relación a los resultados que mostró el ensayo de RT-PCR en tiempo real de las dos MMP's estudiadas, se puede observar que hay un incremento en la expresión de ambas MMP's directamente proporcional al tiempo de exposición al humo de leña, con respecto al grupo control. Los resultados se analizaron por el método estadístico ANOVA y como prueba post hoc, se utilizó la prueba de Dunnett (INERST13) considerándose una  $p < 0.05$ ; encontrándose diferencia significativa para ambas metaloproteasas; MMP-2 (fig 6a) y MMP-9 (fig 6b).

## PCR EN TIEMPO REAL

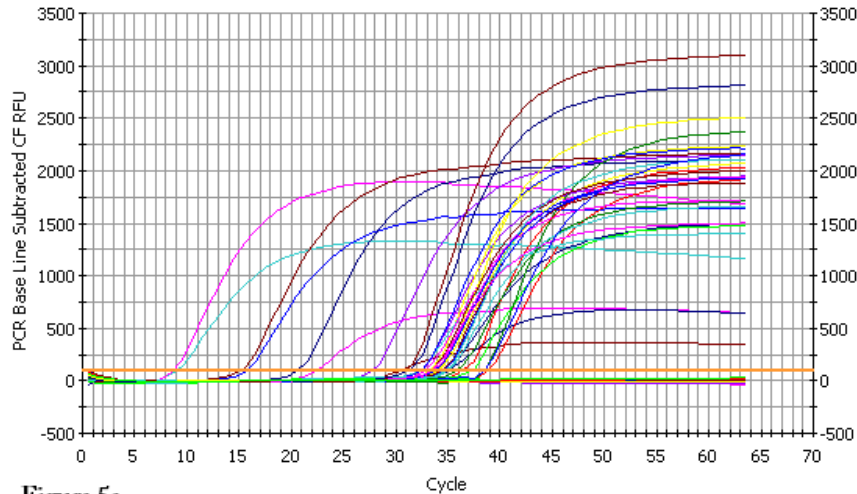


Figura 5a

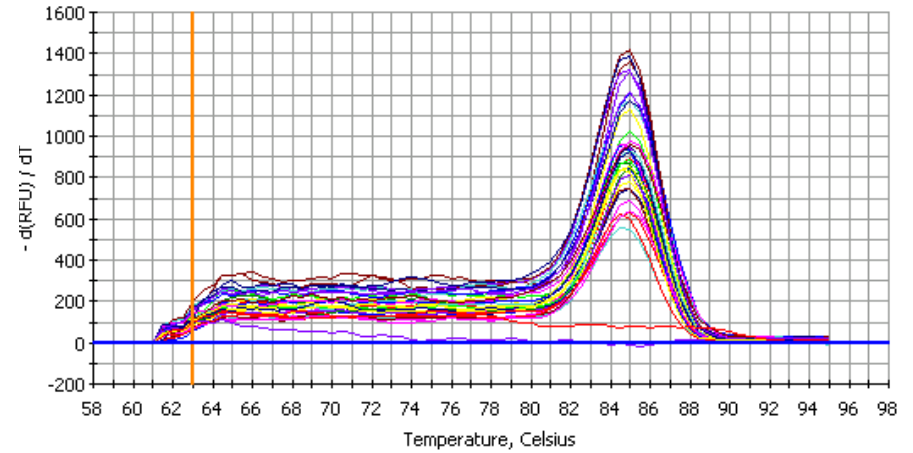


Figura 5c.

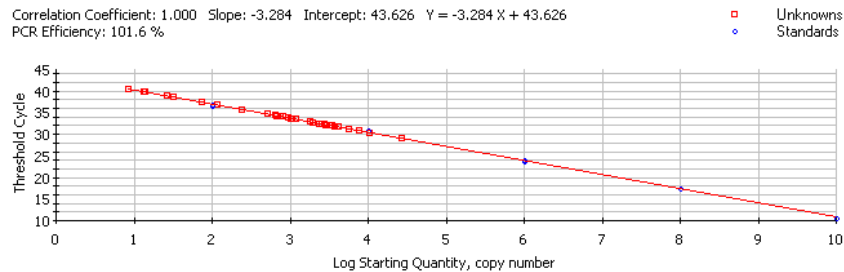


Figura 5b

**Figura 5:** Ejemplo: Cuantificación de la expresión génica para rRNA18s por PCR en tiempo real.

**Fig. 5a:** Amplificación de rRNA 18s detectado con los cambios de fluorescencia. Se ensayaron 9 muestras por triplicado y 5 cDNAs estandar, cada línea representa a una muestra. **Fig. 5b:** Curva estándar donde se graficó el ciclo umbral contra el log de las concentraciones conocidas de los estándares. **Fig.5c:** grafica de la curva de fusión que representa la amplificación de un solo producto específico.

## GELATINASA A

MMP-2	Promedio	S <sup>2</sup>
Controles	4.14	1.15
3 meses	9.64	2.35
7 meses	22.26	4.45

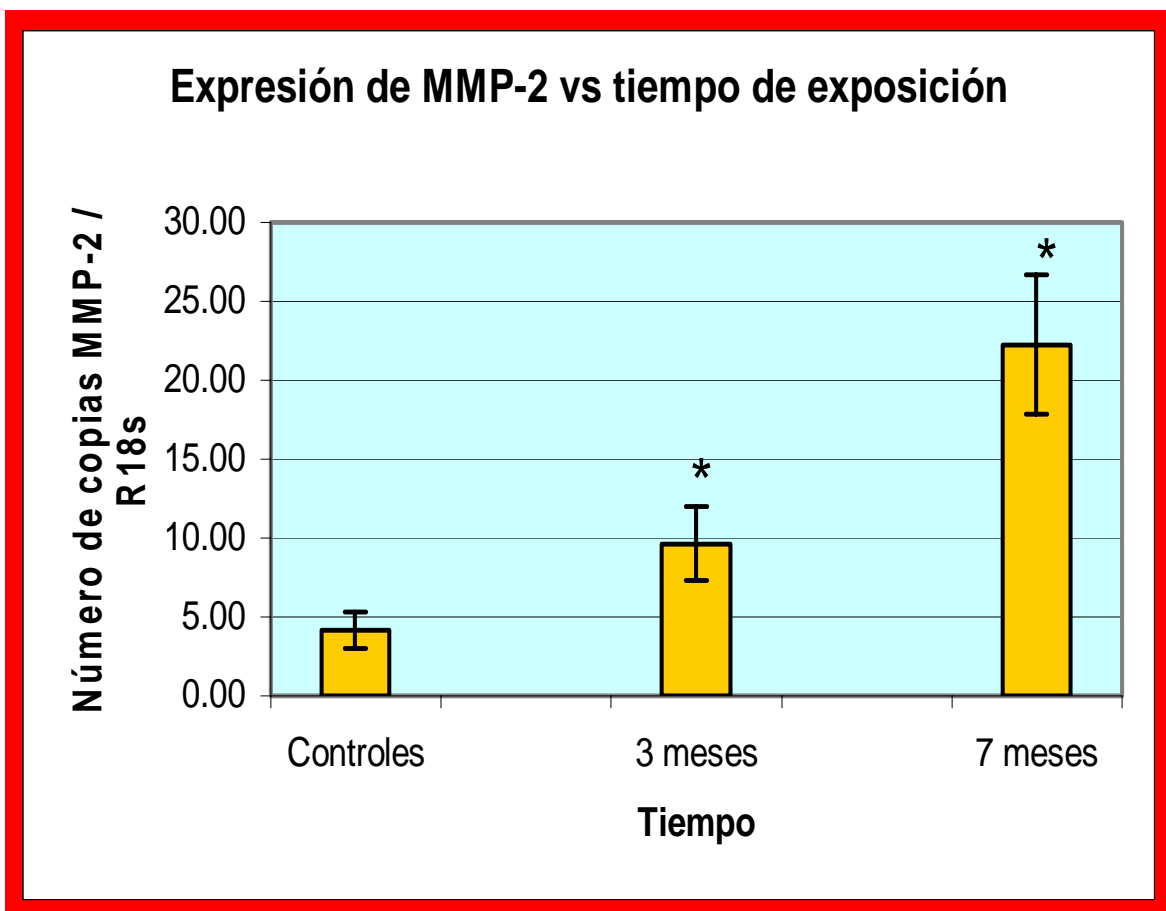
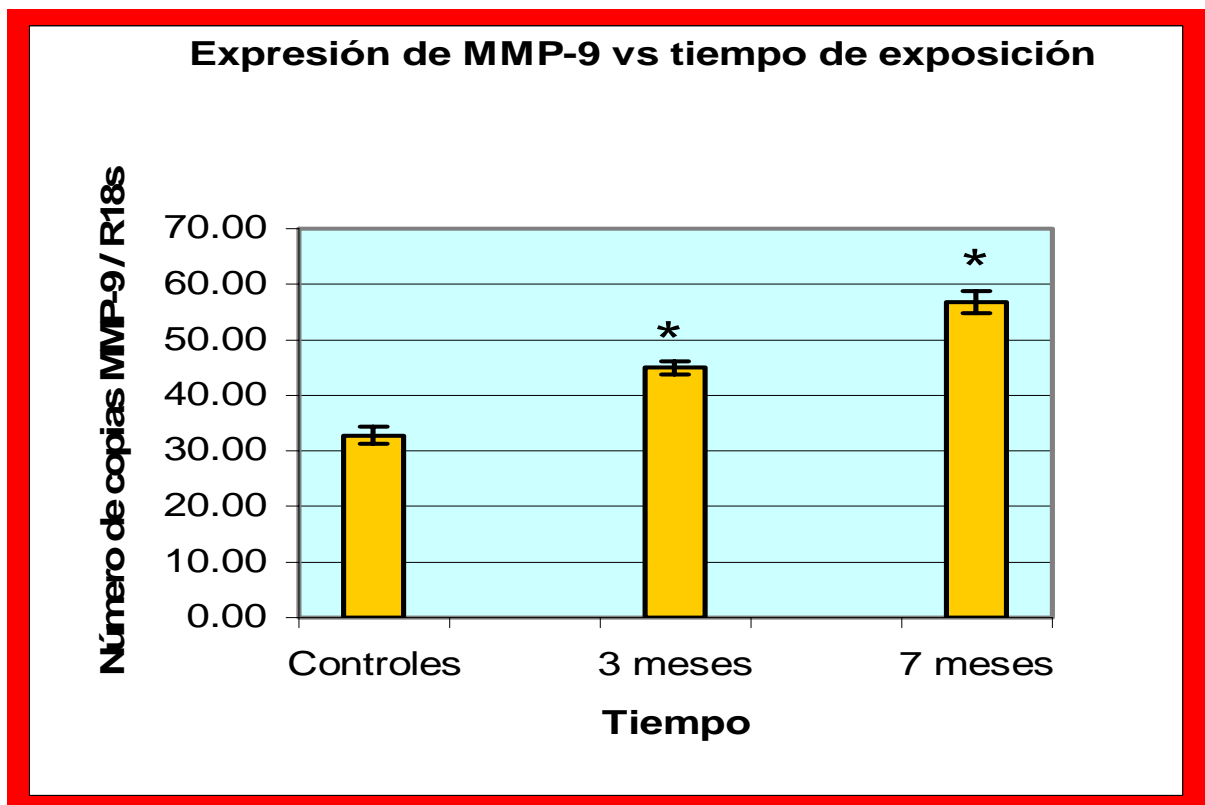


Fig 6a. Se comparan los controles contra los experimentales a 3 y 7 meses de exposición; mostrándose que el nivel de expresión de la MMP-2 es directamente proporcional al tiempo. El cambio es significativo con una p menor a 0.05

## GELATINASA B

MMP-9	promedio	S <sup>2</sup>
Controles	32.82	1.52
3 meses	44.99	1.20
7 meses	56.79	2.03



**Fig.6b** Se comparan los controles contra los experimentales mostrándose un aumento en el nivel de expresión de la MMP-9 directamente proporcional al tiempo. El análisis estadístico demostró que el cambio es significativo para el mes 3 y el mes 7 comparados con el control con una p menor a 0.05



## **ACTIVIDAD GELATINOLITICA DE LA MMP-2 Y MMP-9 EN LBA MEDIANTE ZIMOGRAMAS.**

En el zimograma de poliacrilamida al 8% (Figura 7), se puede ver la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas mediante una zona clara, que da muestra de la degradación del sustrato, estas bandas son del tamaño de 72kb y de 92Kb para MMP-2 y para MMP-9 respectivamente. Dicha actividad se puso de manifiesto comparándose contra un marcador que muestra la degradación del sustrato por ambas metaloproteinasas, así se aseguro que la MMP-2 si tuvo actividad lítica; ya que la banda que demostraba dicha actividad; se observa a la altura de 72kb, sin embargo para la MMP-9 es muy tenue la banda a la altura de 92kb que evidencia su actividad lítica, esto se puede deber a que la concentración proteíca de MMP-9 es muy baja y no se logra observar su actividad por medio de esta técnica.

Para la determinación cuantitativa de los niveles de degradación de proteína generados por MMP-2 se realizó una densitometría de las bandas que mostraban actividad gelatinolítica(Figura 7b). No se realizó la determinación cuantitativa de los niveles de degradación generados por la MMP-9; por los posibles motivos expuestos arriba.

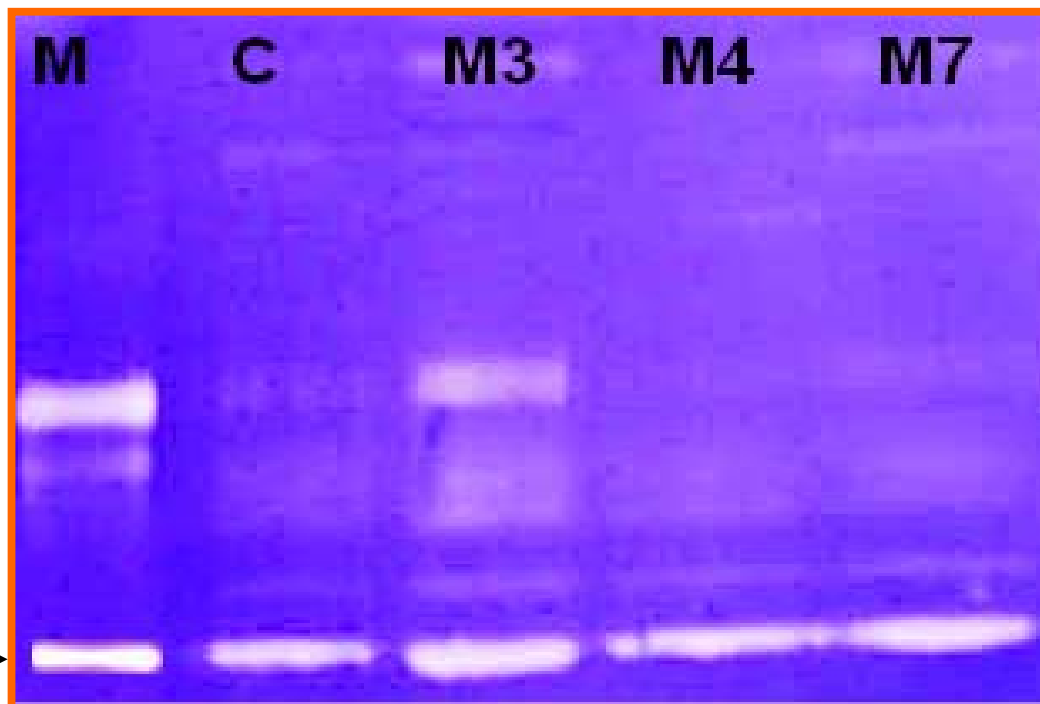
El propósito de la densitometría fue analizar si existe una diferencia significativa, en la actividad gelatinolítica entre los LBA control comparados contra los LBA experimentales.

Los resultados de la densitometría se muestran en la figura 7b, donde se muestra un aumento de la actividad directamente proporcional al tiempo del mes 3 y 4, comparados con el control. Aunque se muestra una disminución de actividad en el mes 7, la tendencia sobre el control de todos los tiempos se mantiene en aumento por lo tanto al tener exposición al humo independientemente del tiempo de exposición habrá un aumento en de la actividad gelatinolítica de la MMP-2.

El análisis estadístico muestra que hay un cambio significativo para el mes 3 y el mes 4 versus control.

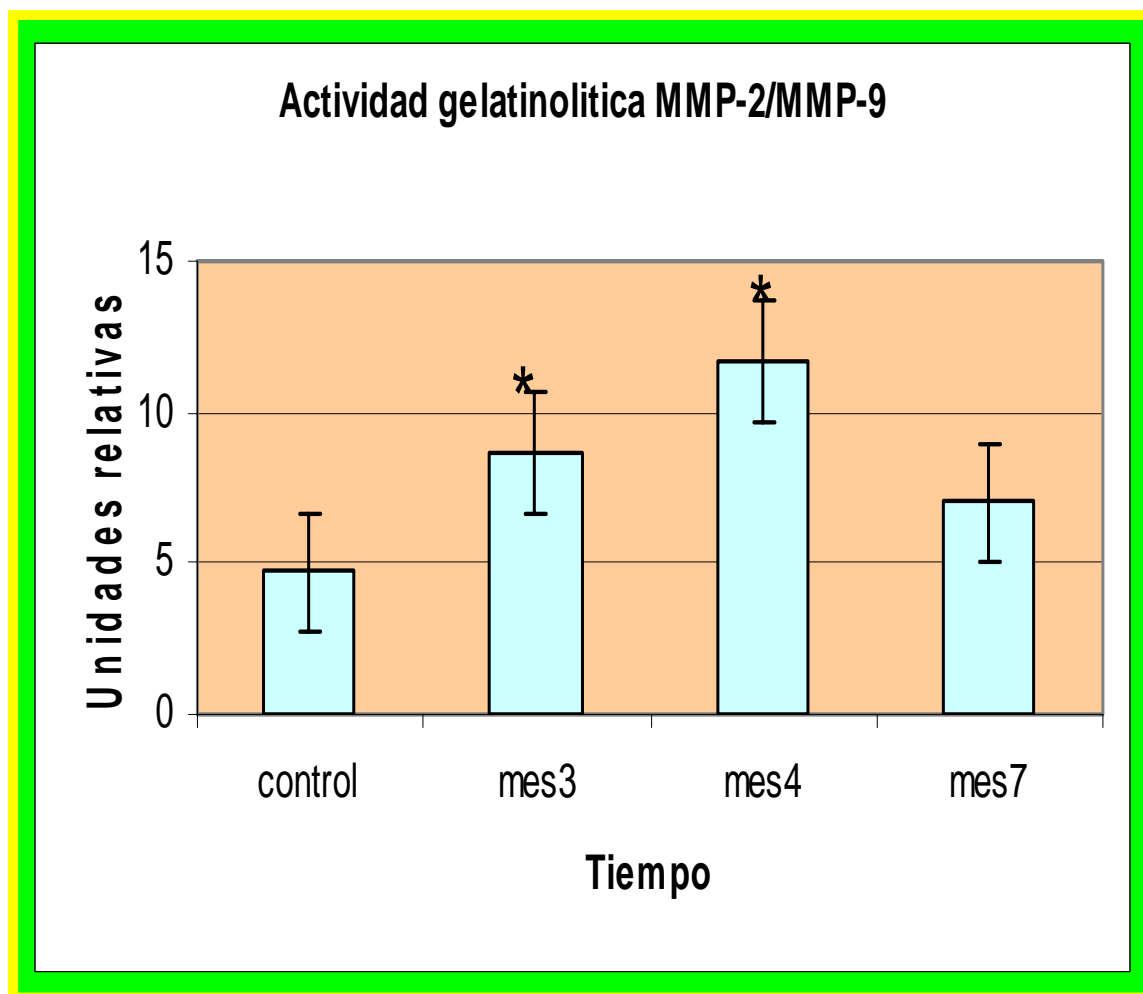
## ACTIVIDAD GELATINOLITICA EN LBA MEDIANTE ZIMOGRAMA.

M (Marcador)    M4 (mes 4)  
C (Control)    M7(mes 7)  
M3 (mes 3)



**Figura 7a.** Gel de zimografía que muestra la actividad gelatinolítica de la MMP-2 a la altura de 72kb, para el LBA del control, comparados con los LBA de mes 3, mes 4 y mes 7 de exposición a humo de leña. Todas las muestras fueron cargadas con  $8\mu\text{g}$  de concentración.

## DENSITOMETRIA DE LA MMP-2.



**Figura 7b.** Grafica que muestra los resultados de la densitometría para la actividad gelatinolitica de la MMP-2 comparando los LBA de controles con los LBA de los experimentales; mostrándose que la actividad de la MMP-2 sobre el control mantiene la tendencia al aumento en cualquiera de los tres tiempos de exposición de los LBA experimentales. El análisis estadístico muestra que el aumento en la degradación gelatinolitica es significativa para el mes 3 y mes 4 comparados con el control.

## **X. DISCUSION.**

La matriz extracelular es importante para la integridad del pulmón en condiciones normales. Cuando es alterada existen cambios en el equilibrio síntesis-degradación de la matriz extracelular; como resulta ser el caso del enfisema pulmonar que es caracterizado por una destrucción difusa de las paredes alveolares, y en la patogénesis de esta enfermedad participan una compleja red de proteasas de serina y metaloproteasas que son capaces de degradar diferentes moléculas de la matriz extracelular, como colágena o elastina entre otras.

Las metaloproteinasas de matriz son proteínas capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular incluyendo membranas basales, en estudios recientes se ha demostrado que hay una ruptura de las paredes alveolares resultante del incremento en las concentraciones de las proteinasas que degradan matriz extracelular entre ellas la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B(MMP-9) y no se cuenta con amplia información de que suceda lo mismo en modelos de enfisema inducido por humo de leña. El enfisema pulmonar es un desorden respiratorio caracterizado por la progresiva obstrucción de las vías aéreas donde el reclutamiento de los monocitos, macrófagos y neutrófilos en el pulmón, atraen a los leucocitos al sitio de lesión llevando a un aumento en la liberación de las elastasas. Simultáneamente, los oxidantes presentes en el humo y los producidos por los fagocitos pulmonares estimulados por el humo inactivan a proteínas del moco bronquial como tripsina, quimiotripsina, catepsina G y a la alfa-1-antitripsina creando un desbalance en el sistema proteasa-antiproteasa a favor del sistema proteasa, permitiendo su acción sobre la elastina pulmonar, destruyéndola y donde la elasticidad no puede ser regenerada.

Se ha demostrado que el proceso de inflamación del enfisema pulmonar incluye tanto células inflamatorias como células del sistema inmune. Observándose un incremento de Linfocitos T y macrófagos presentes en la inflamación alveolar. Los macrófagos son las células inflamatorias que se observan a menudo; secretan enzimas elastólicas así como catepsina K, L y S. Los neutrófilos se encuentran aumentados<sup>48</sup>, liberando proteasas séricas incluyendo la elastasa de neutrófilo (NE), catepsina G y proteinasa-3 así como las metaloproteinasas que contribuyen a la destrucción alveolar. Estas serinas son por otra parte potentes estimulantes de moco. Ocasionan un desequilibrio en el sistema proteasa-antiproteasa, habiendo una pérdida de la elasticidad que no puede ser regenerada. El reclutamiento de neutrófilos involucra la adhesión a células endoteliales, posteriormente los neutrófilos migran atraídos por los factores quimiotácticos (IL-8 y TB4) que da inicio a la destrucción alveolar<sup>49</sup>.

Los macrófagos y los neutrófilos potencian el estrés oxidativo y liberan enzimas proteolíticas. Los oxidantes reaccionan con muchos componentes celulares oxidando proteínas, lípidos y bases del DNA y las enzimas degradan a ECM que constituye la estructura del pulmón.<sup>30,31,50</sup> El stress oxidativo se produce cuando ROS son producidas en exceso como un mecanismo de defensa ante los oxidantes activando también a NF- $\kappa$ B, AP-1, MAPK's que posteriormente inducen una inflamación neutrofílica via IL-8, CxCR1, TNF- $\alpha$ , y metaloproteinasas.

La utilización de modelos animales experimentales permiten analizar con mayor facilidad la participación de las diferentes enzimas in vivo. Así pues el objetivo de este trabajo fue el analizar la expresión de la gelatinasa A, y la gelatinasa B en modelo animal simulando enfisema pulmonar provocado por humo de leña demostrándose la presencia y aumento de expresión de ambas metaloproteasas. Los resultados de los cortes histológicos mostraron que había un daño tanto de ruptura como de inflamación de las paredes alveolares; de esta manera se pudo observar que las características de un enfisema provocado por humo de leña a nivel histológico son similares a un enfisema provocado por humo de tabaco; y

como ya se menciona, las gelatinasas tienen especificidad por la colágena tipo IV, (que es el principal componente de las membranas basales y elastina), lo cual podría ser la causa de la destrucción de las paredes alveolares mostradas en los cortes histológicos de los pulmones experimentales.

El análisis bio-informático, nos dio una idea de la homología que existe entre la MMP-2 humana con la MMP-2 de cobayo, (lo mismo para la MMP-9), convirtiéndose en una herramienta de trabajo importante para obtener información de secuencias que nos puedan servir para analizar expresión génica aún sin contar con las secuencias de ARNm en el GENE BANK.

Por RT-PCR, se observó que hay expresión de las MMP's de interés con los oligos específicos para cada MMP. Además se evaluaron los niveles de expresión génica de ambas metaloproteasas por PCR en tiempo real. Encontrándose que en los pulmones de los animales experimentales existe una mayor expresión de MMP-2 y MMP-9, y que el aumento de dicha expresión es directamente proporcional al tiempo de exposición. Esto nos llevó a pensar que en el enfisema provocado por humo de leña, también se apoya y se corrobora la teoría del desequilibrio de proteasa-antiproteasa, ya que este es resultado del incremento en las concentraciones de las proteinasas que degradan matriz extracelular, y como se explicó desde un principio recientes estudios han propuesto la participación de las MMP's, quedando de manifiesto en este trabajo dicha participación de ambas gelatinasas<sup>32</sup>.

En cuanto a los niveles proteicos, debido a que no se cuentan con anticuerpos específicos para cobayo, se utilizó la técnica de zimografía para tener una idea de los niveles de proteínas de MMP-2 y 9, que se secretan del pulmón. En este trabajo quedó de manifiesto, la actividad gelatinolítica para ambas gelatinasas, sin embargo al momento de realizar la determinación cuantitativa de los niveles de degradación mediante la densitometría, solo se logró determinar la de MMP-2; ya que probablemente los niveles de MMP-9 están por debajo de los niveles de detección de la técnica de zimografía.

Pero es importante que los resultados muestran un aumento de actividad gelatinolítica procedente de los pulmones de los animales expuestos a humo de leña; aunque se vió claramente que en el mes séptimo de exposición disminuía la actividad gelatinolítica. El análisis estadístico arrojó que había un cambio significativo para el mes 3 y el mes 4 versus control. Es importante decir que a pesar de que en el mes siete disminuye la degradación proteolítica siempre se mantuvo una tendencia de aumento por encima del control en todos los meses de exposición.

A pesar de múltiples estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo modelos animales, los procesos patogénicos de la enfermedad del enfisema provocado por humo de leña no se conocen con precisión. Es por esto que todavía queda mucho por investigar y realizar al respecto de esta enfermedad para tener un panorama más global de la patogénesis y los factores involucrados, por que en este trabajo solo se enfocó a las gelatinasas, pero como se mencionó hay más proteinasas que degradan la matriz extracelular, además de que posiblemente haya un decremento en los niveles de sus inhibidores como también se mencionó, y como se hizo hincapié sobre la teoría de las elastasas; principalmente las que son sintetizadas por los neutrófilos y macrófagos. Además de que también este trabajo puede ser una pauta para continuar con el estudio de otras metaloproteasas involucradas en el enfisema; como puede ser la MMP-12 (metaloproteasa de macrófagos) o la MMP-1 (colagenasa intersticial) donde se tienen datos que su expresión también está aumentada por el humo de tabaco. Además de que se podría medir todavía varios parámetros que esclarecieran más el proceso patológico que conlleva la exposición al humo de leña.

## **XI. CONCLUSIONES.**

- Los niveles de expresión génica pulmonar de MMP-2 y la MMP-9 están aumentados en el desarrollo del enfisema inducido por humo de leña.
- Para la proteína MMP-2 se encontró siempre un aumento significativo en su actividad gelatinolítica, durante el desarrollo del enfisema.



## XII. ANEXO 1

Para realizar la curva estandar para cada gen, se hicieron diluciones seriales desde  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^2$  de número de copias, para este fin primero se cuantifico el DNA a una concentración 1:10 obteniéndose el valor en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Del análisis del Blast se obtuvo el tamaño del producto en pares de bases este numero se multiplico por 662 (valor establecido para convertir pb en g/mol), una vez que se tenían las unidades en g/mol se dividió entre el numero del avogadro para obtener el numero de copias por gramo, posteriormente el valor de la concentración de DNA (previamente cuantificado) se divide entre el numero de copias por gramo, obteniéndose finalmente el numero de copias por microlitro para realizar las diluciones seriales mencionadas arriba.

Ejm.

$$159\text{p.b} (662) = 105\,258 \text{ g/mol}$$

$$(105\,258\text{g/mol})/6.022 \times 10^{23} = 1.7478 \times 10^{-19} \text{ número de copias/ gramo}$$

$$(1.7478 \times 10^{-19}) / (.025 \times 10^{-6} \text{g}/\mu\text{L}) = 1.4303 \times 10^{11} \text{ número de copias/microlitro.}$$

### **XIII. APENDICE.**

#### **Buffer TBE 0.5X**

Para un Lt.

30.25 g de Tris Base

15.42 de Ac. Bórico

1.86 g EDTA

#### **Amortiguador de carga.**

Glicerol 10%

Azul de bromofenol 0.05%

Tris 62.5mM

#### **Solucion teñidora**

Azul de coomasie 0.3mM

Metanol 40% v/v

Acido acetico glacial 10%

#### **Solución desteñidora**

Metanol puro            25 mL

Ac. Acético glacial 25 mL

H<sub>2</sub>O                        200 mL

#### **Buffer incubación**

Glicina/CaCl<sub>2</sub>        100 mL

ZnCl<sub>2</sub>                    5 mL

#### XIV. REFERENCIAS.

---

- <sup>1</sup> Giraldo H, Diagnostico y manejo integral del paciente con EPOC, Editorial Medica Panamericana, Segunda edición, Cap. I – IV. 2003
- <sup>2</sup> Fuente INEGI. Censo 2000.  
[http://www.inegi.gob.mx/est/librerias/tabulados.asp?tabulado=tab\\_vi07b&c=780](http://www.inegi.gob.mx/est/librerias/tabulados.asp?tabulado=tab_vi07b&c=780)
- <sup>3</sup> Evans M y Pryor W. Cigarette smoking, emphysema, and damage to  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor. *Am J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol)*; 271: L734-L743, 1996.
- <sup>4</sup> Selman M, Montañó M, Ramos C, Vanda B, Becerril C, Delgado J, Sansores R, Barrios R, and Pardo A. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 271: L734-L743, 1996
- <sup>5</sup> Merck y Dohme. Manual de Merck. Capitulo 31.  
[http://www.msd.com.mx/publicaciones/mmerck\\_hogar/seccion\\_04/seccion\\_04\\_031.html](http://www.msd.com.mx/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_04/seccion_04_031.html)
- <sup>6</sup> Guyton A, Tratado de fisiología medica , El Sevier, Onceava edición, pág. 478,481,2006
- <sup>7</sup> Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola y Selman M, Upregulation of gelatinases A and B, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*, 117: 684 - 694.2000
- <sup>8</sup> Pardo A, Selman M, Proteinase-antiproteinase imbalance in the pathogenesis of emphysema; The role of metalloproteinases in lung damage. *Histol Histopathol* 14: 227-233, 1999.
- <sup>9</sup> C Hogg Senior R, Chronic obstructive pulmonary disease c 2: Pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*, 57(9): 830 - 834. 2002.
- <sup>10</sup> Carp H, Millar F, Potencial Mechanisms of emphysema,  $\alpha$ 1-AT deficiency, *Lancet* ;152-154. 1985.
- <sup>11</sup> Gene R, Giugno E, Abbate E, Figueroa-Casas J, Mazzei J. Nuevo consenso argentino de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Medicina*; 63: 5/1.2003
- <sup>12</sup> Mahadeva R, Shapiro S.D., Chronic obstructive pulmonary disease • 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* ; 57:908-914, 2002

- 
- <sup>13</sup> Montaña M, Becerril C, Ruiz V, Ramos C, Sansores RH, González-Avila G. Matrix metalloproteinases activity in COPD associated with wood smoke. *Chest* 2004;125:466–472 .
- <sup>14</sup> Shapiro S. The Macrophage in Chronic obstructive pulmonary Disease. *Am J. Respir Crit care Med*; 140 s29-s32.1999.
- <sup>15</sup> Pardo A; La matriz Extracelular y los diferentes tipos de colagena, Facultad de ciencias, UNAM, 156-163; 1993.
- <sup>16</sup> Vizoso F, Martínez A, Vázquez J, Lamelas ML, Rodil A, García Muñiz JL. Significación biológica y clínica de las enzimas proteolíticas y sus inhibidores en los carcinomas humanos. *Cir Esp* ; 68: 471-485.,2000
- <sup>17</sup> Myllyharju J.y Kivirikko, K, Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms *Trends Genet.* 20, 33-43, 2004
- <sup>18</sup> Jimenez F. Biología celular y molecular. Ed. Prentice Hall. Segunda edición. Pág. 515-544.2003
- <sup>19</sup> Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T, Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 1-2;253:269-285,2003.
- <sup>20</sup> Nagase H, Woessner JF ,Matrix metalloproteinases: a minireview. *J Biol Chem* 274:21491-21494, 1999.
- <sup>21</sup> Pardo Annie, Selman M. Matrix Metalloproteases in aberrant Fibrotic Tissue Remodeling. *Proc Am Thorac Soc*; 3:383-388,2006.
- <sup>22</sup> Thiennu H. y Zena W. Matrix metalloproteinases: effectors of development and physiology, *Genes and Development* 14: 2123-2133,2000.
- <sup>23</sup> Parks W y Shapiro S. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*; 2:10-19,2001
- <sup>24</sup> Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* ;12(12):1075–1095,1998.
- <sup>25</sup> Visse R y Nagase H .Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839. 2003.
- <sup>26</sup> Pons L. Metaloproteinasas y matriz extracelular dérmica. *OFFARM.* 23: 147-149.2004

- 
- <sup>27</sup> Patterson ML, Atkinson SJ, Knäuper V, Murphy G .Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett* 503: 158–162. 2001
- <sup>28</sup> (Suplemento <http://circes.ahajournals.org/cgi/data/92/8/827/DC1/1>)
- <sup>29</sup> Conant K y Gottschall P. Matrix metalloproteinases in the central nervous system.  
[http://www.worldscibooks.com/medsci/etextbook/p390/p390\\_chap01.pdf](http://www.worldscibooks.com/medsci/etextbook/p390/p390_chap01.pdf)
- <sup>30</sup> Neil J. Clendeninn y Krzysztof A. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy (Cancer Drug Discovery and Development) Humana Press, Primera edición, pág. 1-79, 2004.
- <sup>31</sup> Flettcher, D,S, Saito A.Guidebook to the extracelular matriz; page: 1-131, 2003.
- <sup>32</sup> Palosaari H. Matrix metalloproteinases (mmps) and their specific tissue inhibitors (timps) in mature human odontoblasts and pulp tissue. Oulu, 1-110.2003.
- <sup>33</sup> Dylan r. Edwards. The tissue inhibitors of metalloproteinases TIMPs, Biol. Chem, page: 62-77; 2003
- <sup>34</sup> Yan C y Boyd D. Regulation o Matriz Metalloproteinase gene expresión. J. Cell. Physiol. 211: 19-26. 2007
- <sup>35</sup> Gaire M, Magbanua Z, Mc Donnell S, McNeil L, Lovett D, Matrisian L, Structure and Expression of the Human Gene for the Matrix Metalloproteinase Matrilysin.J Biol Chemistry; 269, 2032-2040.1993
- <sup>36</sup> Nobukuni S, Watanabe K, Inoue J, Wen FQ, Tamaru N, and Yoshida M. Cigarette smoke inhibits the growth of lung fibroblasts from patients with pulmonary emphysema. *Respirology* 7:217-223, 2002
- <sup>37</sup> Murin S, Smith Bilello K, and Matthay R. Other smoking-affected pulmonary diseases. *Clin. Chest Med.* 21:121-137, 2000
- <sup>38</sup> Ohnishi K, Takai M, Kurokawa Y, Satomi S, and Konttinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab. Invest.* 78: 1077-1087, 1998.
- <sup>39</sup> Gross P, Pfitzer,E.A, Experimental emphysema: it´s production with papain in normal and silicotic rats. *Arch. Envirom. Health* 11:50-58, 1965

- 
- <sup>40</sup> Ericsson S. Pulmonary emphysema and alpha1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand.* 175:197-205. 1964.
- <sup>41</sup> Hautamaki, R.D, Kobayashi D.K, Requeriment of macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Sciences.* 277:2002-2004, 1997.
- <sup>42</sup> Niewoehner DE, y Hoidal, JR. Lung fibrosis and emphysema: divergent response to a common injury? *Science* 217: 359-360, 1982
- <sup>43</sup> Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA, y collaborating Centers. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*; 155:242-248, 1997.
- <sup>44</sup> Wright J, Churg A. A model of tobacco smoke-inhuced airflow obstruction in the guinea pig. *Chest.* ; 121, 188s-191s,2002
- <sup>45</sup> Harkness J, Murray K, Wagner J. Biology and Diseases of Guinea Pigs. *Laboratoty Animal Medicine.* Segunda edición. Capitulo 6. 203-214. 2002
- <sup>46</sup> Altschul S, Gish W., Miller W, Myers E.W. y Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410. 1990
- <sup>47</sup> Altschul S Madden L, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W y Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.*Nucleic Acids Res.*25:3389-3402.1997
- <sup>48</sup> Segura L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD *Chest*;117:684-94,2000
- <sup>49</sup> Barnes PJ, Shapiro SD, and Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* **22**: 672-688.2003
- <sup>50</sup> Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2;5(1):18,2004.