



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TITULO DE LA TESIS

Evaluación de la fibrosis pulmonar inducida por
bleomicina en ratones deficientes
de uPARAP/Endo 180

Para obtener el título de biólogo:
Presenta

Francisco Javier Gaytán Cervantes

TUTORA:
Dra. Annie Pardo Semo.

2007

Este proyecto fue apoyado por la Universidad Nacional Autónoma de México;
proyectos: PAPIIT IN 200106 y macroproyecto SD1.PTID.05.6.



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.

Datos de hoja del jurado

Datos del alumno.

Gaytán
Cervantes
Francisco Javier
57593808
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099110471

1.- Jurado y asesor

Dra. Annie Pardo Semo.

2.- Jurado

Dr. José Guadalupe Cisneros Lira.

3.- Jurado

M. en C. María Isabel de la Cruz Laina.

4.- Jurado

M. en C. Beatriz Rodarte Murguía.

5.- Jurado

M. en C. Moisés Eduardo Selman Lama.

Datos del trabajo escrito.

Evaluación de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones deficientes de uPARAP/Endo 180.

39 p.

2008

Índice

	Página
1.- Matriz extracelular	3
• Familia de colágenas	4
• Elastina	6
• Proteoglicanos	7
• Glicosaminoglicanos	8
• Glicoproteínas	9
-Fibronectina	9
-Laminina	9
-Entactina	10
• MMP's.....	10
2.- Familia receptora de manosa	12
3.- uPARAP/Endo 180	14
4.- Fibrosis Pulmonar	17
5.- Objetivo.....	19
6.- Material y métodos.....	20
7.-Resultados.....	25
8.- Discusión y conclusión.....	33
9.- Apéndice.....	35
10.- Referencias	36

1.-Matriz Extracelular (MEC)

La MEC es una compleja red macromolecular de proteínas y carbohidratos que se localizan en el exterior de las células entre el epitelio y endotelio de animales multicelulares y desempeña un papel muy importante en la arquitectura e integridad estructural de los organismos multicelulares. Su presencia es muy variable dependiendo a que órgano hagamos referencia, por ejemplo en piel, cartílago, hueso y tendón es muy abundante a comparación de cerebro y médula espinal en donde es un elemento muy escaso; además no solamente la encontramos en órganos, también se localiza en vasos sanguíneos, paredes intestinales, revestimiento del globo ocular, por mencionar sólo algunas pequeñas estructuras (1-3).

Sin embargo, la MEC no es una sustancia de soporte inerte como se creía anteriormente, sino que juega un papel activo en la interacción célula-MEC esencial como la proliferación, apoptosis, diferenciación, migración y adhesión celular.

Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular son producidas localmente por células de la matriz y en la mayoría de los tejidos conectivos estas macromoléculas son secretadas por células llamadas fibroblastos, pero en algunos casos específicos como cartílago y hueso estas son secretadas por células de la familia de fibroblastos como son los condroblastos para el caso de cartílago y osteoblastos en el caso de hueso (2).

¿Pero de qué está formada la MEC?

Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular son de cuatro grandes tipos: (a) colágenas (b) fibras elásticas (Elastina), (c) proteoglicanos y glicosaminoglicanos (d) glicoproteínas multifuncionales (laminina, fibronectina, tenascina y otras. Cada una desempeña funciones de manera integrada con las demás, esto hace que la matriz sea calificada como un verdadero complejo funcional; las colágenas y la elastina constituyen la arquitectura de la matriz extracelular, en tanto que las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión del sustrato intercelular, importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Los glicosaminoglicanos y proteoglicanos tienen un papel fundamental en el equilibrio hidroelectrolítico y ácido básico.

La MEC mantiene un equilibrio gracias al balance dado por la degradación, síntesis y regulación de sus componentes, un desequilibrio de estos componentes se presenta en estados patológicos como en enfermedades de tipo degenerativo, por ejemplo, la fibrosis pulmonar, en donde hay un gran depósito de colágena intersticial, el enfisema pulmonar donde ocurre una degradación de ésta, en especial de fibras elásticas o artritis reumatoide en donde hay una degradación continua de moléculas de cartílago (4).

A continuación se presentará un resumen de las características de los componentes principales de la MEC.

Familia de Colágenas

Para entender a la matriz extracelular hay que entender como se relacionan e interactúan los elementos que la componen y empezaremos por la familia de las colágenas, ya que éstas son el elemento principal de las matrices extracelulares, de hecho las colágenas en sus diferentes tipos constituyen una tercera parte de toda la masa protéica de los animales, son proteínas de secreción, sintetizadas por las células del tejido conectivo y algunas otras células.

Las colágenas son proteínas estructurales de matriz y a la fecha se han identificado alrededor de 28 tipos de colágenas (tabla 1). Estas proteínas tienen en común uno o más dominios con una estructura de triple hélice formada por tres cadenas polipeptídicas denominadas α y cada una de estas cadenas poseen una unidad de tres aminoácidos que se repiten Gly, X, Y, donde el 30% de las posiciones X y Y están ocupadas por prolina e hidroxiprolina. La glicina, el más pequeño de los aminoácidos se encuentra hacia el interior de la triple hélice ayudando al empaquetamiento de la estructura secundaria de la colágena mientras que la prolina e hidroxiprolina le dan la rigidez y estabilidad a la molécula. Cada cadena α tiene una forma de hélice que gira a mano izquierda alrededor de 3.3 residuos de aminoácidos por cada vuelta, además de que estas tres cadenas helicoidales están enrolladas con un giro a mano derecha, sobreponiéndose una sobre la otra hasta formar la estructura de triple hélice (1,3). La tabla 1 nos muestra un panorama de los 28 tipos de colágena descritos hasta hoy (1-6). Es de hacer notar que aun hay poca información relacionada a los tipos de colágena que han sido descritas recientemente, como se observa para las colágenas XIX a XXVIII (6)

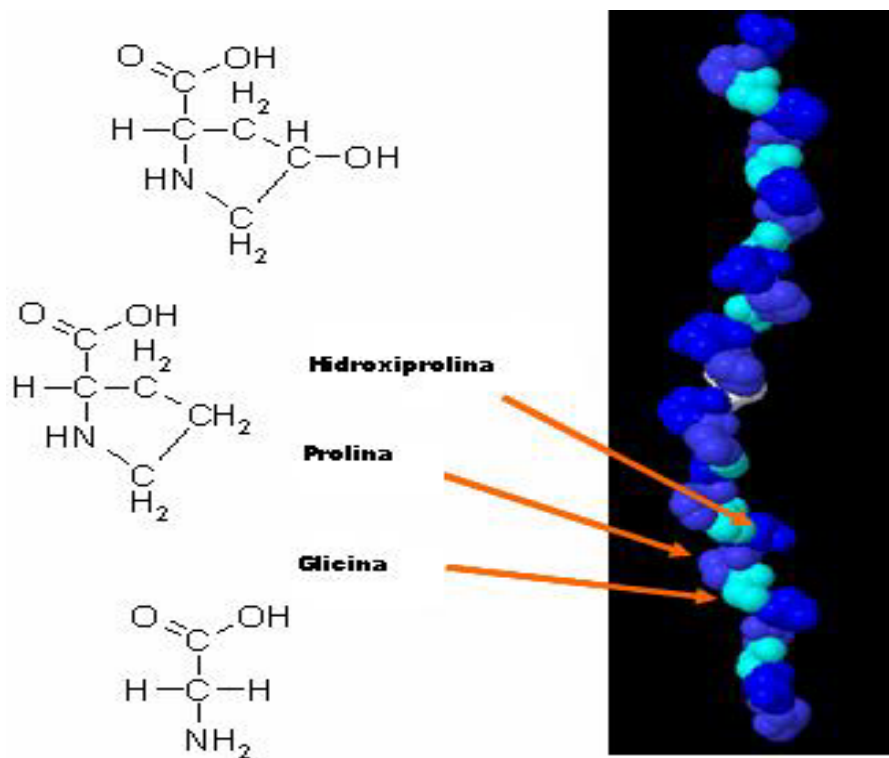


Figura 1 Modelo de molécula de colágena, compuestos por sus tres cadenas α y localización de los tres diferentes aminoácidos que se repiten en su estructura. Figura modificada de http://www.steve.gb.com/science/extracellular_matrix.html

Tabla 1. Tipos de colágenas.

Tipo de colágena	Distribución en el tejido	Forma
I	Se localiza en hueso, tendones, ligamentos, cornea, órganos internos, constituye aproximadamente el 90% de la colágena de todo el cuerpo.	Fibrilar
II	Cartílago, notocorda y humor vítreo en el ojo	Fibrilar
III	Se produce por fibroblastos, se puede localizar en piel, vasos sanguíneos, órganos internos.	Fibrilar
IV	Se localiza en la lámina basal y membranas basales del glomérulo.	Reticular
V	Acompañan al tipo I para formar fibrillas heterotípicas y fibrillas delgadas.	Fibrilar
VI	Filamentos en rosario de matrices del estroma que interactúan con fibrillas y células.	Filamentosa
VII	Filamentos que se unen a membranas basales epiteliales. Sintetizada por queratinocitos.	Fibras de anclaje
VIII	Se localiza en matrices endoteliales, y en otros organismos como gusanos en la cutícula y en el exoesqueleto de las esponjas. Sintetizada por células endoteliales.	Redes hexagonales
IX	Asociado a fibras de colágena tipo II y XI en	Asociadas a

	cartílago hialino, humor vítreo.	fibras
X	Cartílago hipertrófico,	Redes hexagonales
XI	Junto con la tipo II forma fibras heterotípicas, se localiza en cartílago.	Fibrilar
XII	Tendón y piel, además interactúa con la tipo I.	Asociada a fibras
XIII	Células endoteliales asociada a membrana celular. Interactúa con colágena I y III.	?
XIV	Piel fetal y tendón.	Asociada a fibras
XV	Participa en la estabilización de las estructuras de las membranas.	Asociada a fibras
XVI	Interacción con otras proteínas de la matriz.	Asociadas a fibras
XVII	Forma parte de los sitios de unión entre matriz y célula.	Fibras
XVIII	Participan en la estabilización de la estructural de las membranas así como interacción con algunas integrinas.	Filamentos
XIX	Interacciona con proteínas de matriz.	Asociada a fibras
XX	Interacciona con proteínas de matriz.	Asociada a fibras
XXI	Interacciona con proteínas de matriz.	Asociadas a fibras
XXII	Interacciona con proteínas de matriz.	Asociada a fibras
XXIII	Participa en la formación de sitios de unión célula – matriz.	
XXIV	-----	Fibrilar
XXV	-----	
XXVI	-----	Asociada a fibras
XXVII	-----	Fibrilar
XXVIII	-----	Filamentosa

Tabla 1. Obtenida y modificada de <http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen>, (3-6).

Elastina

Esta proteína altamente hidrofóbica que se sintetiza en forma soluble, se modifica, se empaqueta y se transporta a sitios de la superficie celular, en donde se producen uniones cruzadas y el ensamble final que nos dará como resultado la formación de fibras.

La elastina posee una composición de aminoácidos muy particular, ya que contiene una muy baja proporción de residuos ácidos o básicos y una alta composición de aminoácidos hidrofóbicos. La elastina tiene un alto contenido de prolina y glicina, como

la colágena, pero algo que la diferencia de ésta es que no está glicosilada, además presenta un bajo contenido de hidroxiprolina y carece de hidroxilisina.

Contiene una gran variedad de derivados de lisina y éstos participan en la formación de las uniones cruzadas covalentes entre los monómeros de elastina, que a su vez son muy importantes ya que le confieren gran parte de las propiedades elásticas a la molécula.

La elastina está constituida por moléculas solubles de tropoelastina, y por una glicoproteína denominada fibrilina. La tropoelastina está formada por cadenas de polipéptidos con 800 residuos de aminoácidos derivados de la lisina, es una proteína hidrofóbica de 65 a 75 kDa (7, 8).

Proteoglicanos

Estas macromoléculas son conformadas por una proteína central, generalmente rica en residuos de serina y treonina, a la cual se le unen, a partir de uniones covalentes, una o más cadenas lineales de carbohidratos llamados glicosaminoglicanos (GAG).

Los proteoglicanos (PG) son moléculas que se localizan en matriz extracelular, en las superficies celulares asociadas a la membrana celular o plasmática, también los encontramos en el interior de las células. Desempeñan un papel de suma importancia en la organización estructural de los tejidos y en la regulación de algunos factores de crecimiento, a los cuales pueden unirse, además de tener características adhesivas y antiadhesivas.

El tamaño de los PG varía por la proteína central ya que ésta puede ir desde los 10 kDa hasta los 400 kDa (figura 2) la cual puede unir una o varias cadenas de GAG's. Entre los PG más grandes podemos encontrar el agregán y el versicán que son parte de varios tejidos, por ejemplo, el agregán se localiza en cartílago, a este PG se le unen alrededor de 100 moléculas de GAG, su proteína central pesa alrededor de 220 kDa. Por otro lado, el versicán es rico en condroitín y dermatán-sulfato y se ha localizado en vasos sanguíneos, piel, cerebro y cartílago (7).

Pero no solo los PG grandes sobresalen, también tenemos PG pequeños que realizan papeles importantes, por ejemplo al interactuar con diferentes factores de crecimiento o en la formación de nuevas fibras de colágena, dentro de estos PG tenemos el biglicano o la decorita, por mencionar algunos.

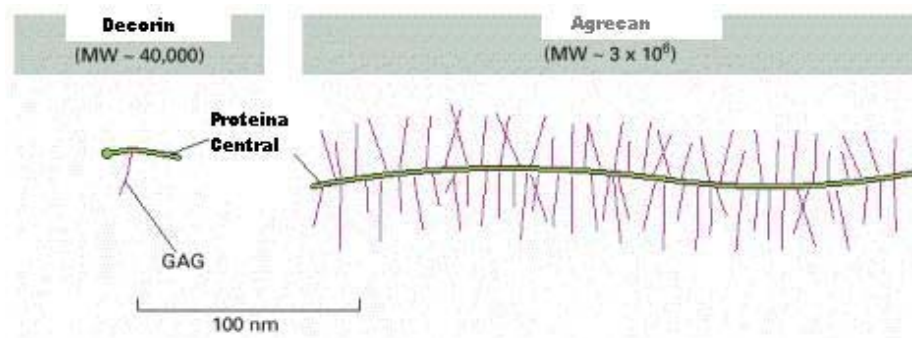


Figura 2 Proteoglicanos de diferente tamaño.
modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mboc4.figgrp.3544>

Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAG) están formados por cadenas de polisacáridos no ramificadas que consisten en una estructura dimerica repetida. Una de las dos azúcares siempre será ácido glucurónico o idurónico o galactosa, que se alternará con la otra azúcar que puede ser N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina.

Los GAG son muy aniónicos debido a sus grupos sulfato y carboxilo, esta característica ayuda a la atracción y sujeción de moléculas de agua que participan en la turgencia de los tejidos (8,9).

Los GAG están representados por los siguientes grupos

- heparina
- heparán y condroitín sulfato
- dermatán y keratán sulfato
- ácido hialurónico

Glicoproteínas

Las glicoproteínas encontradas en la matriz extracelular son: fibronectina (FN), laminina (LN), entactina (EN). Para cumplir con sus funciones estas moléculas necesitan de otras que sirven de unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto celular, como son: las integrinas, las caderinas, las inmunoglobulinas y las selectinas (8,9).

Fibronectina

Esta proteína multifuncional se puede encontrar tanto en forma soluble, circulando en el plasma, como en su forma insoluble formando parte de la MEC. Esta molécula se conforma por 2 subunidades polipeptídicas ensambladas por puentes disulfuro. Esta familia posee alrededor de 20 miembros, todos provenientes de un mismo gen estructural, pero con modificaciones alternativas de RNA. Estas modificaciones nos darán origen a los diferentes polipéptidos que forman la familia de las fibronectinas.

La estructura de esta molécula es altamente conservada y repetitiva, con 3 unidades básicas denominadas homologías I, II y III que forman el esqueleto de la proteína. Este tipo de moléculas desempeñan un papel fisiológico trascendente en la formación de la MEC, así como en la adhesión y migración de células. Se sabe que la fibronectina extracelular actúa como sustrato para la adhesión celular durante la embriogénesis y la organogénesis (8,9).

Laminina.

Es una glicoproteína con forma de cruz compuesta por tres cadenas polipeptídicas diferentes, denominada α 1, β 1 y β 2. Componen una familia de siete miembros o variantes, constituidos por ocho subunidades. Las cadenas β 1 y β 2 tienen un peso molecular de 230 y 220 kDa, respectivamente y la α de 440 kDa. Las cadenas son unidas por enlaces disulfuro que conformarán la estructura en forma de cruz. Este tipo

de molécula está altamente glicosilada y alrededor de 15 a 30 % de su peso se debe a carbohidratos.

La laminina contiene regiones compatibles con receptores tipo integrinas y la interacción se da a través de varias secuencias de aminoácidos, localizados en varios dominios de las moléculas. La laminina tiene un papel biológico muy importante participando en la promoción de la unión celular, migración, polarización de epitelio renal durante el desarrollo, así como la diferenciación de las células endoteliales en estructuras capilares. Se han descrito diferentes formas de laminina pero todas tienen una estructura altamente conservada, las diferencias muchas veces radican en las asociaciones de las cadenas con algún otro elemento (8-10).

La laminina es un componente importante de la membrana basal, también conocida como lamina basale, que es una estructura de la MEC que separa a las células epiteliales y endoteliales del tejido conjuntivo.

Entactina

La entactina es una glicoproteína sulfatada que, combinada con la laminina, forman un complejo muy estable y ambas son parte de la membrana basal. Posee una estructura muy asimétrica con dos extremos globulares, contiene de 5 a 13 % de carbohidratos. Se caracteriza por tener 3 dominios: el dominio I corresponde a la porción globular (extremo amino terminal), el dominio II que es una región rica en cisteína y que sirve de puente para unirse al dominio III que corresponde al extremo carboxilo terminal (8).

Metaloproteinasas de matriz

El equilibrio de la matriz extracelular se mantiene por una regulación entre la síntesis y degradación de la misma matriz. Este es un proceso regulado por las moléculas que estimulan su elaboración, como los factores de crecimiento y otros factores que regulan la endocitosis y degradación intracelular.

Las MMPs (Metaloproteinasas de matriz) son las principales responsables de la degradación de la matriz extracelular y tienen un papel en diversos procesos como

morfogénesis, angiogénesis e inflamación. Las MMPs son una familia de endopeptidasas que contienen zinc en su dominio catalítico, poseen un dominio propeptídico que mantiene a las enzimas en forma de zimógenos y un dominio carboxilo terminal tipo hemopexina.

Las MMPs se pueden agrupar en diferentes familias que incluyen colagenasas, gelatinasas, estromelinas y las metaloproteinasas tipo membrana.

Estas enzimas son inhibidas principalmente por un conjunto de inhibidores tisulares conocidos como TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) (11).

Se sabe que cuando la proteína asociada al receptor activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPARAP/Endo180) junto con el receptor activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPAR) y el activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) se unen para activar al plasminógeno y transformarlo en plasmina, este último interactúa con las MMPs y las activa (8).

2.- Familia receptora de manosa

La familia receptora de manosa es un subgrupo de la superfamilia de lectina tipo-C que está conformado por cuatro proteínas solubles y receptores transmembranales (figura 3) (12,13).

*Receptor de manosa (RM)

*Receptor de fosfolipasa A2 de tipo-M (PLA2R)

*DEC-205/gp200-MR6

*Endo 180/uPARAP (proteína asociada al activador del plasminógeno tipo urosinasa)

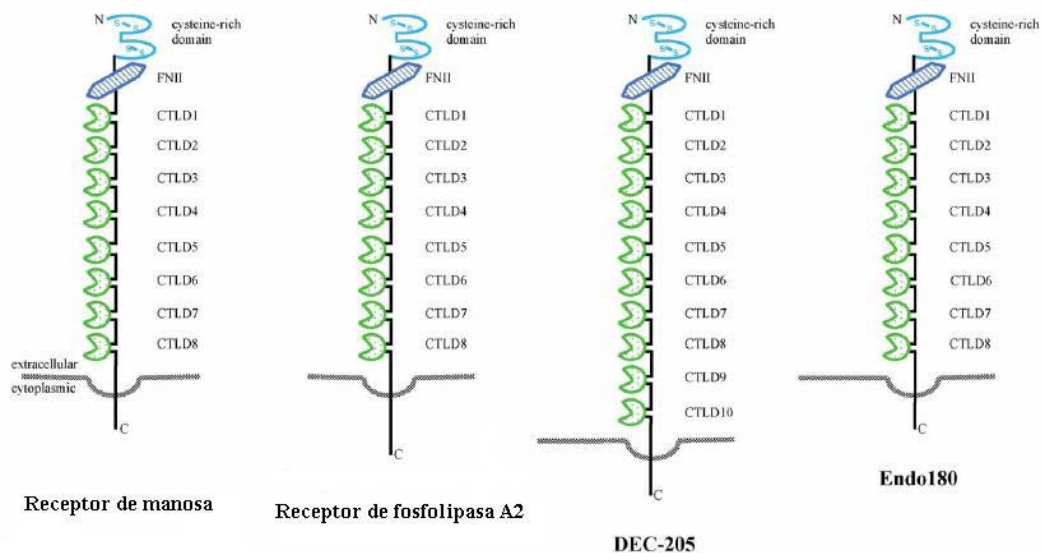


Figura 3 Representación esquemática de los miembros de la familia receptora de manosa tomada y modificada de la referencia 5.

Se trata de glicoproteínas transmembranales que comparten una organización estructural común, con un dominio rico en cisteínas en el extremo N-terminal, seguido de 8 a 10 dominios de lectina tipo C(CTL Ds). Tras una región transmembranal sencilla aparece un tramo corto citoplasmático que se encarga de dirigir el tráfico de estos receptores entre la membrana plasmática y los endosomas. Estos receptores utilizan las propiedades de reciclado para dirigir la unión de ligandos extracelulares y su transporte hacia el interior celular. Los distintos receptores de esta familia participan en varias funciones que se centran en procesos de degradación de la matriz extracelular, el transporte de colágeno al interior celular y el sistema inmune (13).

Receptor de manosa.

El receptor de manosa (RM) o también conocido como CD 206 fue inicialmente localizado en macrófagos alveolares de conejo con un peso de 175 kDa, juega un papel en el sistema inmune innato que se activa y protege al hospedero durante las primeras horas de la infección, ya que activa fagocitos como macrófagos que encapsulan a los organismos invasores.

Pero para que estos organismos sean captados es necesario que los fagocitos expresen receptores en sus superficies celulares que reconocerán a ciertos organismos patógenos. El RM está ligado con una amplia variedad de organismos, como por ejemplo *Pneumocystis carinii* (15), *Leishmania donovani* (16), *Mycobacterium tuberculosis* (17) y *Klebsiella pneumoniae*(18).

El RM es importante para reconocer a diferentes microorganismos y así poder fagocitarlos, a través de receptores. Pero el RM no sólo es exclusivo del sistema inmune innato, también se ha visto expresado en el endotelio linfático y hepático, en células de hígado y en células de músculo liso de tráquea (12,19).

Receptor de fosfolipasa A2 (sPLA2)

La fosfolipasa A2 (PLA2) es una enzima clave en el metabolismo de los fosfolípidos. La PLA2 extracelular es segregada en la sangre por el páncreas como enzima digestiva (tipo I) o es liberada por las plaquetas activadas (tipo II). Se ha visto que este tipo de enzima está aumentada en las membranas del cerebro, donde cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana para liberar ácidos grasos libres y productos citotóxicos como la lisofosfatidilcolina. La PLA2 juega un papel esencial en la regulación de las propiedades físicoquímicas de la membrana neuronal, que influye en la función receptora y en la transducción de las señales.

La activación de la fosfolipasa A2 conlleva a la liberación de ácido araquidónico libre, que se convierte por medio de la ciclooxigenasa en endoperóxidos de prostaglandinas, para formar por último el potente agregante plaquetario tromboxano A2 (TxA2), así como prostaglandinas estables, como la PGD2, que también inhibe la agregación plaquetaria (12,13,19)

DEC – 205 (CD205)

DEC-205 se ha visto expresado en células dendríticas, se ha demostrado que está ligado a la internalización de antígenos, así como en la diferenciación e inhibición del crecimiento celular. Se ha visto expresado también en algunos epitelios y en algunas células del endotelio. (13,19). Se sabe que interactúa con IL-4, lo cual ayuda a la maduración de células epiteliales.

3.- uPARAP/Endo 180

uPARAP/Endo 180 es una nueva glicoproteína transmembranal con multidominios que fue identificada en la interacción receptor-activador del plasminógeno tipo pro-urocinasa, en la superficie de algunos cultivos celulares. La uPARAP/ Endo 180 es miembro de la familia receptora de manosa tipo I, la cual se caracteriza por tener los siguientes dominios: un dominio amino-terminal, un dominio tipo B lectina rico en cisteína, un dominio de fibronectina tipo II (FN-II), además de una serie 8 y 10 dominios de carbohidratos tipo C que son dominios de reconocimiento, un dominio transmembranal, y un pequeño COOH-terminal (20-24).

Se ha reportado que uPARAP interactúa con dos enzimas extracelulares: la MMP-13 y uPAR (receptor activador del plasminogeno tipo uricinas) (25,26). Estudios previos han demostrado que uPARAP y uPAR participan en la remodelación y degradación de la matriz extracelular a partir de uPA (activador del plasminógeno tipo urocinasa).

El activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) ha sido localizado en la superficie celular de varias células, con su receptor uPAR. Investigaciones previas ha identificado a uPARAP como parte de un complejo trimolecular, junto con pro-uPA y uPAR, y se ha visto una coexpresión de uPARAP y uPAR durante la osteogénesis. uPARAP y uPAR se han visto expresadas en macrófagos y en algunos subconjuntos de células endoteliales.

Dado que uPARAP es un receptor endocítico, se ha presupuesto que su función es la de regular la internalización de uPAR y, por ello, desempeña un papel muy importante en la modulación de pro-uPA a uPA en la superficie celular (22,25). Mediante este sistema

uPA convierte plasminógeno a plasmina, que es capaz de degradar componentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, en la figura 4 podemos observar cómo al generar plasmina, por medio de uPA, esta plasmina puede contribuir a la activación de las MMPs, que son las responsables de la degradación de la matriz extracelular (figura 4).

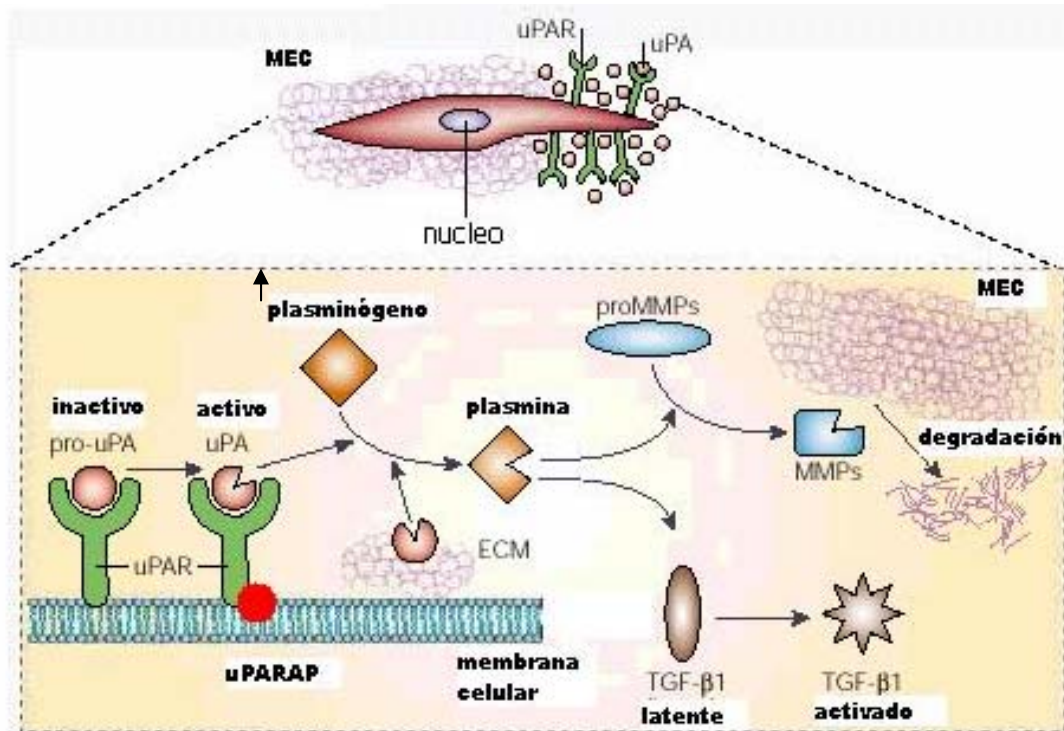


Figura 4. Representa la activación del plasminógeno que pasa a plasmina y esta interactúa con MMP para su activación y futura degradación de matriz extracelular, además de activar algunos factores de crecimiento.

Se ha reportado que uPARAP, además de participar en el sistema uPAR, desempeña un papel importante en la interacción molecular con la colágena, ya que las células deficientes de éste tienen un bajo nivel de adhesión con la colágena de matriz y pierden la habilidad de internalizar colágena soluble (27-29).

uPARAP, al interactuar con unas regiones especializadas de la membrana plasmática, llamadas depresiones revestidas de clatrina, también interactúa con la colágena formando una unión receptor-macromolécula; de esta manera se internaliza la colágena y se guía a los lisosomas para su degradación, posteriormente uPARAP será reciclado y devuelto a la superficie celular, a esto se le conoce como endocitosis por medio de un receptor (30-32).

Se sabe poco acerca de uPARAP y de su interacción entre uPARAP y uPAR, aunque ambas interactúan en el sistema. Dado que este sistema participa en la remodelación de

la colágena (33,34), es importante conocer su papel en la fibrosis pulmonar, donde existe un depósito excesivo de matriz extracelular.

Debido a la falta de modelos *in vivo* de la interacción entre uPARAP y algunos mecanismos de degradación de colágena, se generó un ratón deficiente de uPARAP/Endo180, al observarlo a simple vista, este ratón no presenta cambios externos en su fenotipo, comparado con el ratón que sí posee a uPARAP, esto se debe a que existen diferentes mecanismos que compensan la falta de éste, razón por la cual no hay una diferencia marcada entre ellos a nivel fenotípico.

La generación del ratón nos dará información valiosa en la elucidación de la interacción de los diferentes mecanismos de degradación de colágena, así como entender el papel y las funciones de uPARAP/Endo180 (26).

4.- Fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar es el resultado final de diversos desordenes pulmonares conocidos, como enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID). Se caracteriza por una proliferación anormal de células mesenquimatosas, como son fibroblastos y miofibroblastos, y tiene como consecuencia la acumulación excesiva de proteínas de matriz especialmente de colágena (35).

El desarrollo de fibrosis provoca cambios que son irreversibles y dramáticos en la arquitectura del pulmón junto con una progresiva insuficiencia respiratoria y a una etapa terminal en un periodo de tiempo muy corto. A pesar de que las EPID son diferentes en ciertos aspectos, un número de ellas son de etiología conocida, por ejemplo la exposición a partículas orgánicas e inorgánicas, las asociadas a enfermedades colágeno-vasculares, como esclerosis y artritis reumatoide; sin embargo alrededor del 40 o 50 % de estas enfermedades pulmonares son de etiología desconocida y por lo tanto se llaman idiopáticas (36-38).

Generalmente se sigue una serie de eventos para el desarrollo de la fibrosis pulmonar como lo podemos ver en el esquema siguiente (figura 5):

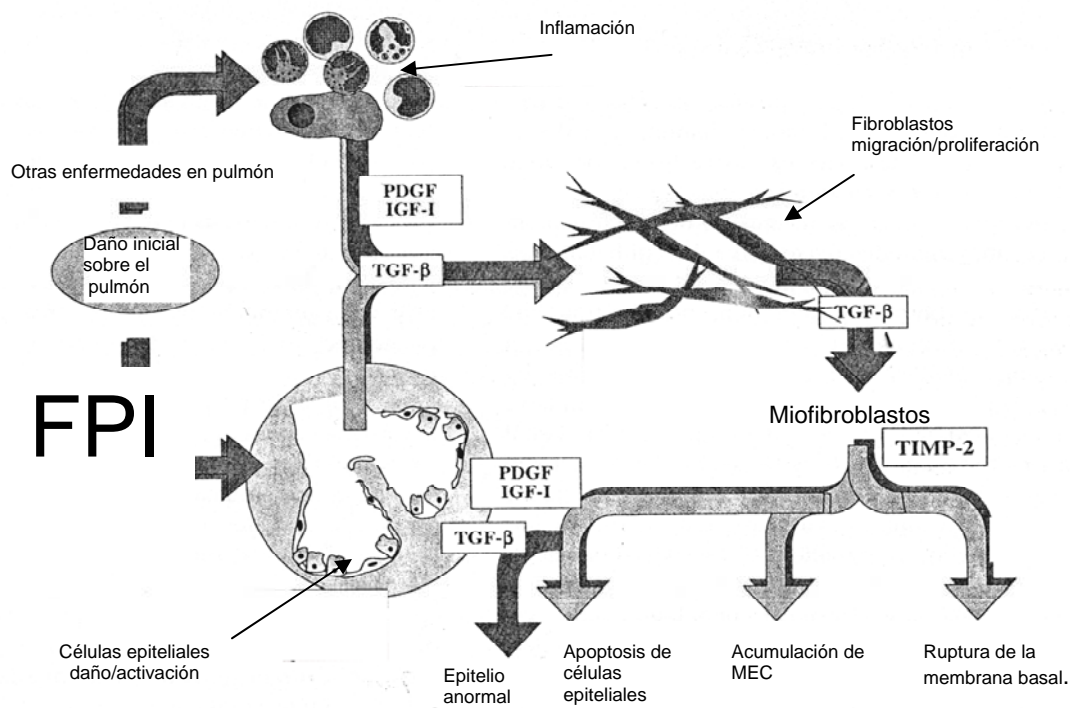


Figura 5. Vía inflamatoria y epitelial para el desarrollo de fibrosis. Tomada y modificada de la referencia 35

Se pueden seguir diferentes vías para el desarrollo de fibrosis pulmonar, la clásica vía inflamatoria que está representada por la neumonitis por hipersensibilidad y la vía epitelial representada por la fibrosis pulmonar idiopática (34).

Modelo experimental de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina

La instilación intratraqueal de bleomicina es actualmente el modelo más popular para el estudio *in vivo* de la FP. El ratón (*Mus musculus*) es la especie más utilizada. Los efectos de la toxicidad pulmonar por bleomicina en humanos son similares en el ratón. La administración intratraqueal de bleomicina produce daño directo al epitelio alveolar, que puede liberar citocinas y factores de crecimiento que participan como quimioatrayentes de células inflamatorias y fibroblastos. Tres días postinstilación hay aumento en el número de células de los septos alveolares debido a la infiltración de células inflamatorias, principalmente macrófagos y neutrófilos. Desde el día seis hasta un mes hay un aumento sostenido de linfocitos que pueden influenciar la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena, liberando factores de crecimiento profibrogénicos. A los 14 días postinstilación se pueden observar cambios difusos y

multifocales, que consisten en hiperplasia epitelial y fibrosis intersticial e intraalveolar. Después de 21 días se pueden observar focos grandes de fibrosis en forma difusa, caracterizados por la presencia de fibroblastos y miofibroblastos y por el depósito de colágenas fibrilares (39).

El modelo de FP inducida por bleomicina desarrollado, tanto en animales trasgénicos como *knockouts*, ha sido muy útil para comprender los mecanismos moleculares que llevan a la fibrosis pulmonar. Los ratones *knockout*, o nulos, son aquellos que carecen de la expresión de un gen específico, generando pérdida de la función de una molécula específica.

En este contexto, para avanzar en el conocimiento del papel que desempeña uPARAP/Endo 180 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, se instilaron con bleomicina ratones silvestres y ratones nulos en la molécula uPARAP/Endo 180 (ratones KO).

5.- Objetivo

Evaluar el papel de uPARAP/Endo 180 en el desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

6.- Material y métodos

En el presente trabajo se utilizaron ratones (*Mus musculus*), pertenecientes a la cepa C57Bl/6. Se utilizaron tanto ratones silvestres (WT) como ratones modificados genéticamente, donde se anuló la expresión del gen que codifica a uPARAP/Endo180 (uPARAP-/-)(KO) Engelholm et al. (<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200211091>) (28).

Los ratones fueron donados por el Dr. Thomas Bugg y Marisa Qunnen de los National Institutes of Health (NIH) y National Institute of Dental and Carcinofacial Institute (NIDCR), Bethesda, Meryland y fueron expandidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Determinación genética

Extracción de ADN

- 1.- Se tomaron fragmentos de cola de ratón de entre 1-1.5cm, fueron rasurados, posteriormente se enjuagaron con agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato), posteriormente se cortaron en fragmentos mas pequeños y se colocaron en un tubo ependorff.
- 2.- Se adicionaron 500 µl de buffer de lisis* y 20 µl de proteinasa K (10mg/ml) y se agitaron en vortex.
- 3.- Se colocaron los tubos en incubación a 55°C toda la noche.
- 4.- Se agitaron los tubos y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 minuto y se recuperó el sobrenadante en un tubo ependorff.
- 5.- Se adicionó 1 ml de etanol absoluto y se agitó hasta ver que se formara la hebra de ADN.
- 6.- Se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante un minuto y se decantó el sobrenadante cuidando el botón de ADN que se formó en el fondo del tubo.
- 7.- Para lavar el botón, se adicionó 1ml de etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto, y se decantó el sobrenadante para así recuperar el botón de ADN.

* Ver apéndice

8.- Se dejó secar el botón de ADN y una vez seco se le agregaron 100 µl de agua dde.

9. – Finalmente los tubos se incubaron a una temperatura de 55°C por 8 horas en agitación constante y el ADN se guarda a -20°C para su futuro trabajo.

Cuantificación de DNA por medio de espectrofotometría.

Para determinar la concentración de ADN se utilizó la espectrofotometría, para lo cual se coloca 1 µl de muestra en 1000 µl de agua dde y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

Para calcular el ADN total se utiliza la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] \mu\text{g/ml} = (A_{260}) (50) (\text{dilución})$$

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para poder identificar el genotipo de los ratones, tanto silvestres (uPARAP/Endo180 +/+, WT) como transgénicos (uPARAP/Endo180 -/-, KO), se amplificaron las secuencias correspondientes por medio de PCR, utilizando las siguientes secuencias de *primers*:

Ratones transgénicos

uPARAPtarg 5'-TCCTACAAATACACGCTGGCGATA-3'

HPRT 5'-GCAGTTCCTTTTAAATGCAA ATCA-3'

Ratones silvestres

uPARAP/Endo180 E3-3' 5'-TCTACACCATCCAGGGAAACTCAC-3'

uPARAP E3-5' 5'-TTAAACTGGTAACAGCTGTCAGTC-3'

Protocolo para PCR

Reactivos (concentración inicial)	1X (concentración final)
MgCl ₂ (25mM)	2µl (2.5mM)
Buffer 10x	2.5µl (1X)
dNTPs (25 mM por nucleotido, total de nucleotidos 4)	1.25µl (.05mM)
H ₂ O	13µl
Primer sense (10 µM)	2.5µl (1µM)
Primer antisense (10 µM)	2.5µl (1µM)
Taq Gold (5u/1µl)	.25µl (1.25 u)

Tabla 2. Mezcla para el PCR. El 1x corresponde a la cantidad empleada de muestra por tubo, obteniendo un volumen final de 25 µl.

Condiciones para la corrida:

WT: 95°/10' | 94°/20'' 60°/20'' 70°/30'' | 72°/5'' 4°/∞

40 ciclos

KO: 95°/10' | 94°/20'' 60°/20'' 72°/25'' | 72°/5'' 4°/∞

40 ciclos

Para analizar los productos de la PCR se realizó electroforesis en geles de agarosa al 2% w/v[§]. El tamaño de los productos de PCR es de 360 pares de bases para el WT y de 180 pares de bases para el KO. Para conocer el tamaño aproximado de los productos de amplificación se utilizó el marcador de peso molecular λ Hind II, ya que este marcado va de 100 en 100 pares de bases.

Instilación de bleomicina

Se instilaron 5 ratones WT y 6 ratones heterocigotos (HT) de 56 semanas de edad con 0.5 unidades de bleomicina por cada 10 g- de peso. Los ratones se sacrificaron 28 días después de la instilación. Por otro lado se usaron como control 5 ratones WT y 5 ratones HT de la misma edad a los cuales no se instiló bleomicina y se sacrificaron simultáneamente. Los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico al 6.4 % inyectado intraperitonealmente. El pulmón derecho se empleó para histología y el pulmón izquierdo se utilizó para la determinación de hidroxiprolina.

[§] Ver apéndice

Lavados Bronquioalveolares.

Se realizaron lavados bronquioalveolares a 6 ratones controles y a 7 ratones con tratamiento, utilizando 2 alícuotas de 800 μl de PBS. Los lavados se centrifugaron a 1500 rpm. por 10 min y el botón obtenido se resuspendió en 100 μl de PBS (amortiguador de fosfatos salina).

Para hacer el conteo total de células, se añadió a 10 μl de la muestra 90 μl de azul de tripano y a los 90 μl restantes se les adicionó 90 μl del fijador CBX.

Determinación colorimétrica de hidroxiprolina

Técnica de Woessner

La técnica de Woessner es un ensayo colorimétrico que mide los residuos de hidroxiprolina, este iminoácido se encuentra en abundancia en la colágena, ya que cada 3 aminoácidos corresponde a hidroxiprolina por lo tanto es una forma indirecta e medir colágena. (40).

Para la determinación de hidroxiprolina, las muestras de tejido fueron deshidratadas previamente en un horno a 100°C, monitoreando constantemente su peso hasta que no tuviera variaciones. Posteriormente, las muestras se hidrolizaron con HCL 6N a 100°C durante 24 h y se neutralizaron a pH 7 empleando HCl o NaOH y finalmente se aforaron a 2 ml con agua dde.

Determinación colorimétrica

1. De cada muestra trabajada, se tomó 100 μl (el volumen de la alícuota puede variar), llevándose a un volumen de 2 ml con agua destilada desionizada.
2. Se preparó una curva estándar de Hidroxiprolina[♦] (100 $\mu\text{l}/\text{ml}$).
3. Se añadió 1ml de Cloramina-T[♦] (preparada en fresco), se agitó e incubó 20 min a temperatura ambiente, esta reaccionara con la hidroxiprolina a fin de oxidarla.

♦ Ver apéndice

4. Se añadió 1ml de ácido perclórico[♦] (HClO₄), se agitó e incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se utiliza este ácido para detener la reacción de la Cloramina T y la hidroxiprolina.
5. Se añadió 1ml de ρ -Dimetilaminobenzaldehido[♦] (reactivo de Erlich) (preparado en fresco), se agitó e incubó 20 minutos a 60° C en baño maría, en este paso la hidroxiprolina oxidada reacciona con el ρ -Dimetilaminobenzaldehido y obtenemos la tonalidad rojiza.
6. Se enfrió y leyó a 557 nm.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y se utilizó el programa InerSTAT-a V1.3. Los datos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar.

[♦] Ver apéndice

7.- Resultados

Determinación genética

Con respecto a la extracción del ADN, es importante tener cuidado de que no esté degradado y con este objetivo se determina su integridad, sometiendo las muestras a electroforesis en gel de agarosa 1% . En la figura 6, se muestra que el ADN obtenido está en buenas condiciones ya que no se observan barridos, que es un indicativo de la degradación del mismo.

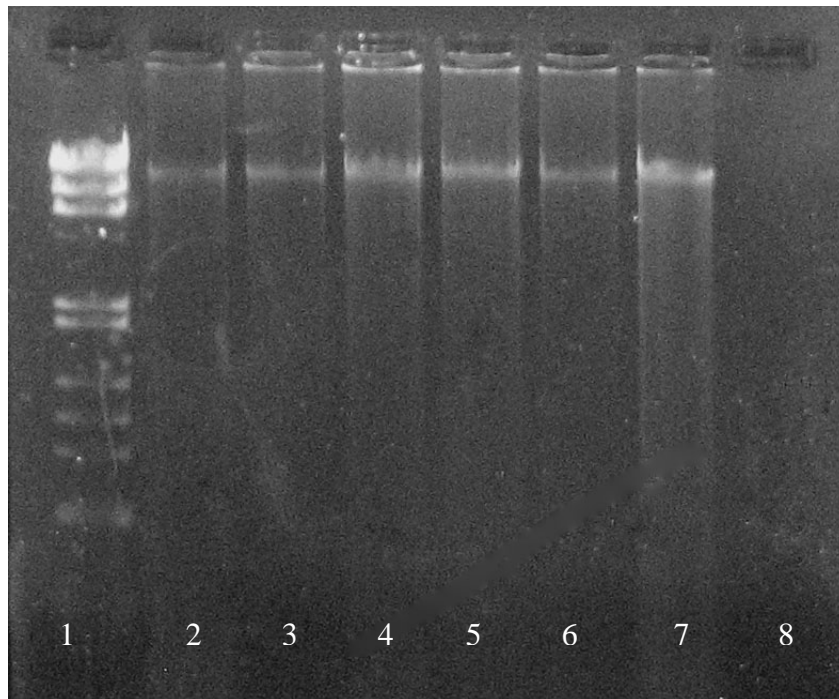


Figura 6. Electroforesis de gel de agarosa, Carriles 1: marcador de pesos moleculares λ Hind II, 2-7: ADN de muestras experimentales, 8: control negativo.

Los Resultados de la PCR permitieron determinar el genotipo de los ratones trabajados. Como se había mencionado anteriormente el tamaño del producto de PCR es de 360 para el genotipo WT y de 180 para el genotipo KO. Como se observa en la figura 7, que representa la electroforesis en un gel de agarosa al 2%, cuando se utilizaron los *primers* del WT el resultado muestra una banda que corre entre los 300 y 400 pares de bases en todos los carriles indicando que las muestras pertenecen a ratones WT.

Por otro lado, en la figura 8 se muestra en los carriles del 3 al 8 una banda de entre 200 y 100 pares de bases que corresponde a los ratones KO; nótese que en el carril 2 no se observa la banda indicando que el ratón pertenece al genotipo WT.

Los ratones heterocigotos (HT) presentan ambas bandas como se puede apreciar en la figura 9, carril 3, donde se observan dos bandas de diferentes pesos moleculares, lo cual nos indica la presencia del genotipo de heterocigoto (HT).

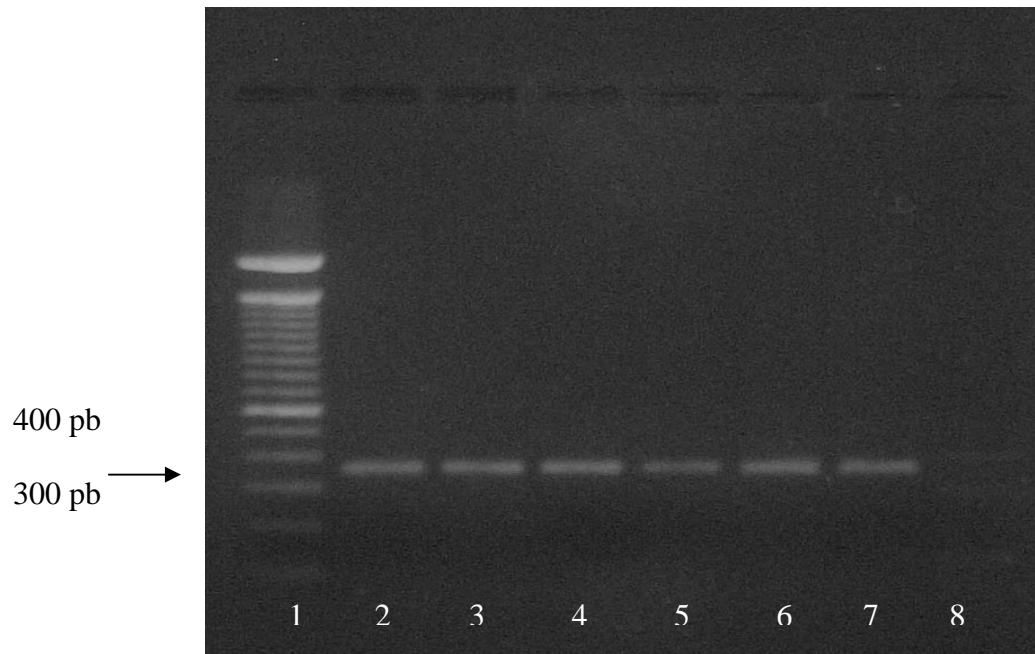


Figura 7. Electroforesis de gel de agarosa, ratones WT, Carriles: 1 pesos moleculares 100 pbs, 2-7 muestras experimentales, 8 control negativo.

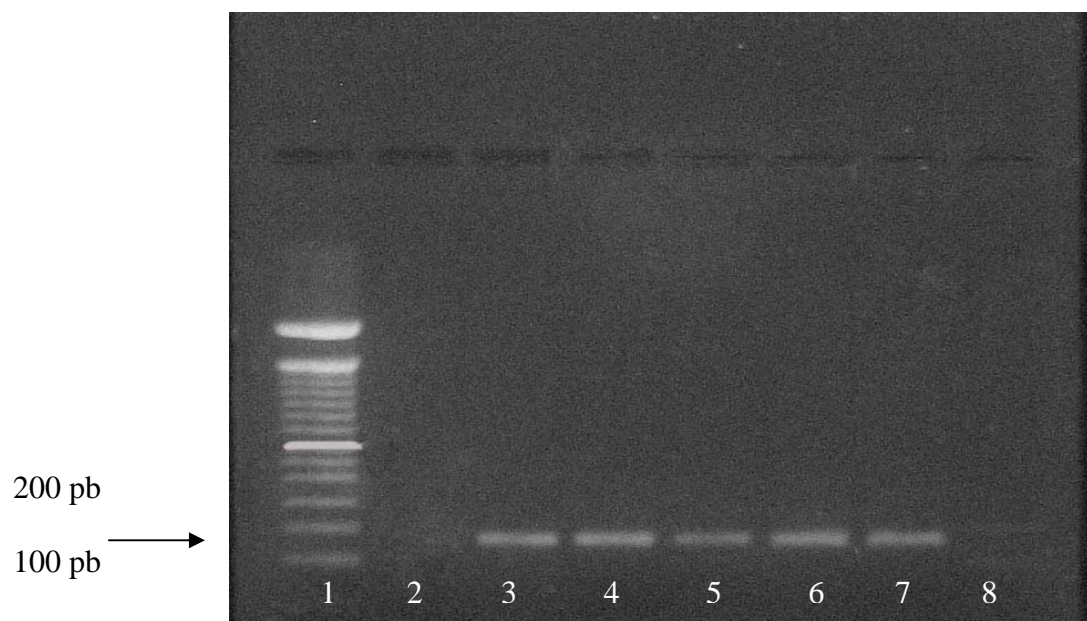


Figura 8. Electroforesis de gel de agarosa, ratones KO, Carriles: 1 pesos moleculares 100 pbs, 2-7 muestras experimentales, 8 control negativo.

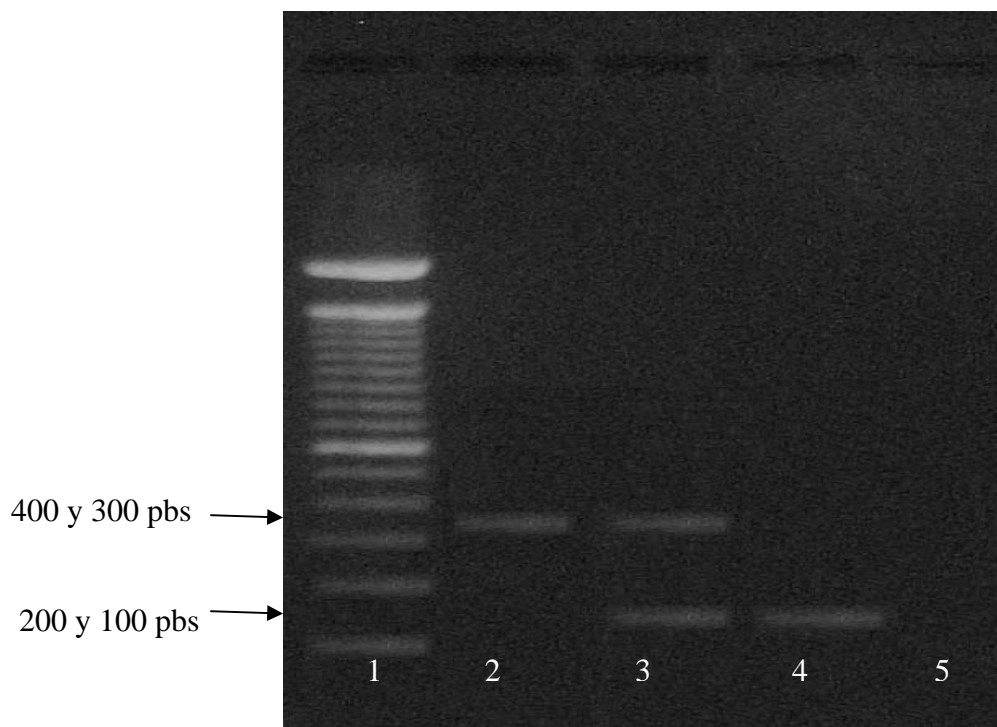


Figura 9. Electroforesis de gel de agarosa Carriles: 1 pesos moleculares, 2 genotipo WT, 3HT, 4 KO, 5 control negativo.

Después de analizar todas las muestras a través de sus productos de PCR y electroforesis en gel de agarosa, se obtuvo el siguiente resultado: 10 ratones con el genotipo WT y 11 ratones con el genotipo HT (heterocigoto).

Es importante hacer notar que, de los 114 ratones de la población total analizada, el genotipo KO apareció sólo 3 veces. Estos 3 ratones se utilizaron como pie de cría y, aunque no hay indicios en la literatura de que éste ratón KO no se pueda reproducir, en nuestro bioterio no se obtuvieron crías. En este contexto, se decidió instilar ratones WT (uPARAP/Endo189 +/+) y ratones HT (uPARAP/Endo189 +/-) y comparar el desarrollo de la fibrosis.

Lavado bronquioalveolar

Los ratones WT y HT instilados con bleomicina se sacrificaron a los 28 días y se hizo un lavado bronquioalveolar en los mismos y en ratones controles.

Como se muestra en la figura 10, el conteo total de células mostró que no hay diferencias significativas entre los ratones WT y HT controles. Sin embargo, después de un mes se observa que los ratones HT instilados con bleomicina presentan un mayor número de células en el lavado, comparados con el WT, pero al realizar el análisis estadístico, pudo observarse que las diferencias no son significativas, por lo tanto se puede decir que tienen un comportamiento muy heterogéneo. (Véase figura 11).

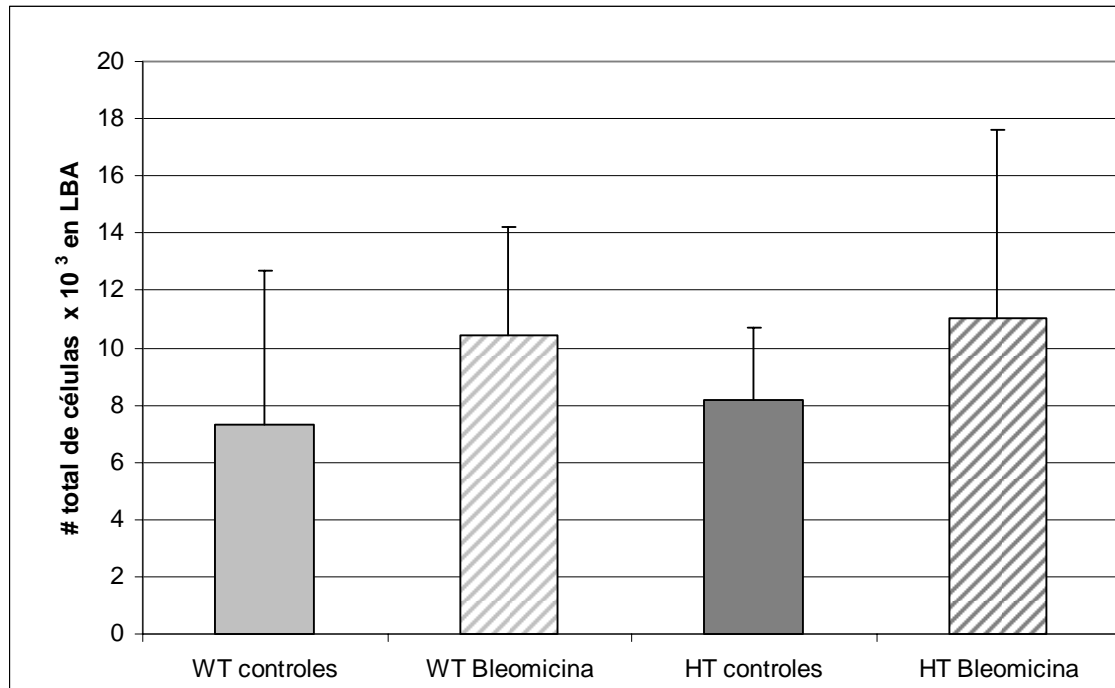


Figura 10. Conteo total celular de ratones control y bleomicina.

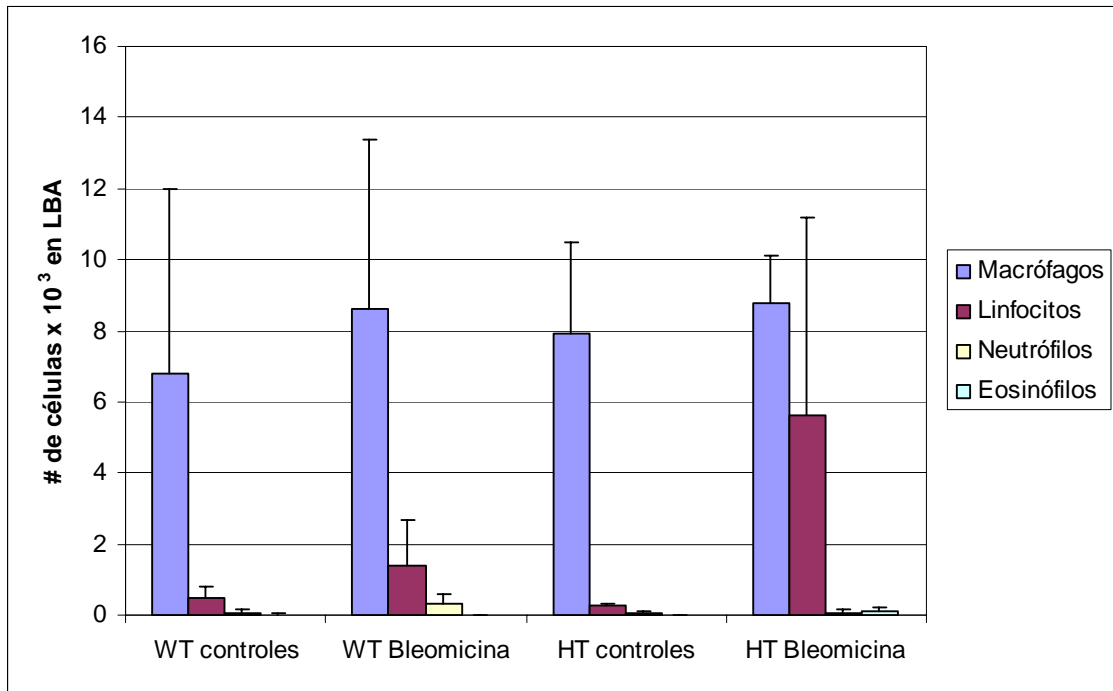
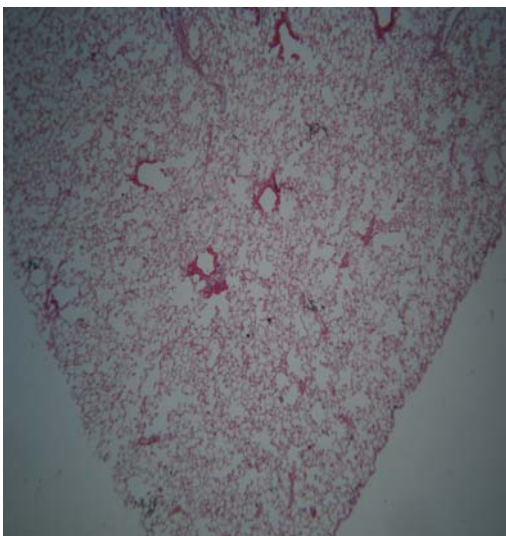


Figura 11. Conteo diferencial de células.

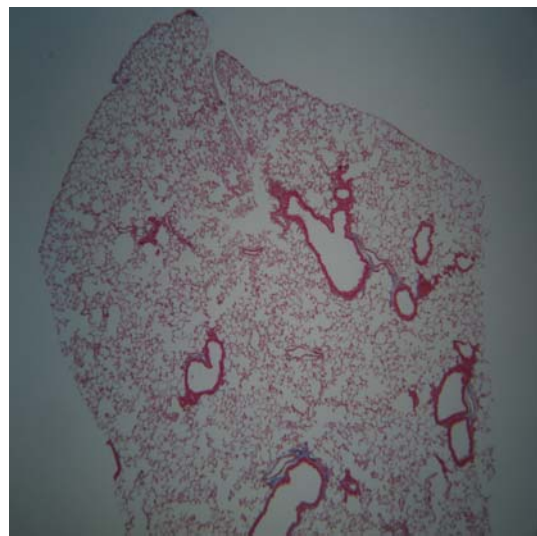
Histología

Los pulmones de ratones WT y HT se tiñeron con la técnica tricromica de Masson que nos muestra a la colágena en color azul, como se muestra en la figura 12 no se observan diferencias entre los ratoners WT y HT.

Controles



WT



KO

Figura 12. Pulmón derecho de ratones controles 4x

En la figura 13 se observan los pulmones de los ratones a 28 días después de la instilación con bleomicina, donde se pueden observar focos de fibrosis con colágena teñida en azul (tinción tricrómica de Masson) y engrosamiento del parénquima pulmonar tanto en los ratones WT como en los HT.

Tratamiento a 28 días

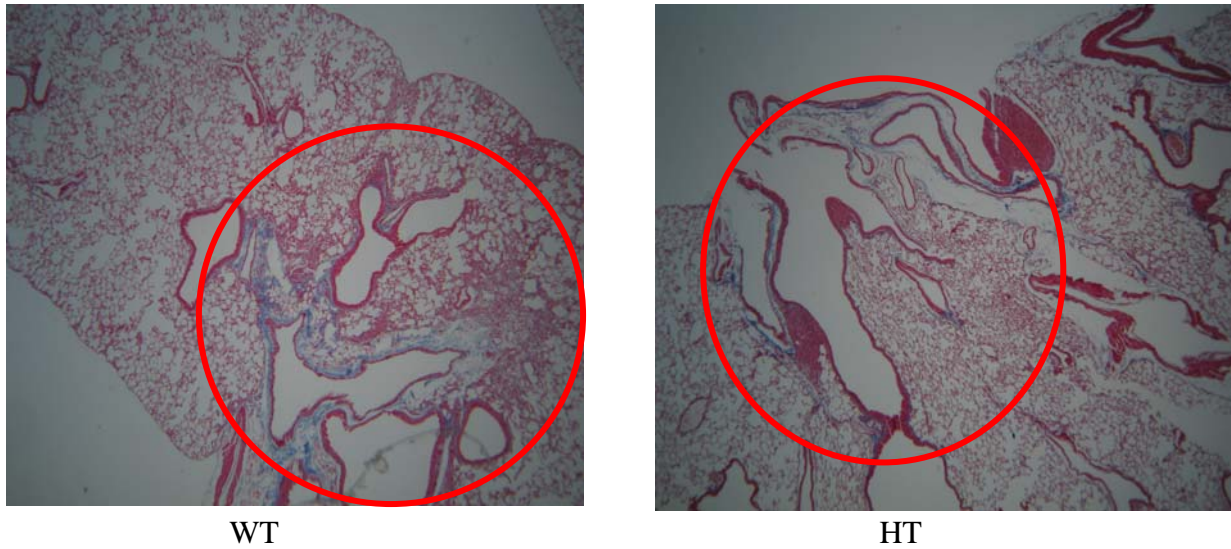


Figura 13. Pulmón derecho de ratones expuestos a bleomicina x10

Determinación colorimétrica de hidroxiprolina (Hyp) por la técnica de Woessner

Con el objeto de hacer una determinación cuantitativa de la colágena acumulada en los ratones instilados con bleomicina, se cuantificó la hidroxiprolina del pulmón derecho de ratones WT y HT controles y bleomicina. En virtud de que después de la instilación murieron 2 ratones con genotipo WT y otro con genotipo HT, al final del experimento se contó con 3 WT y 4 HT.

Los resultados se muestran en la tabla 3.

CONTROL WT µg de Hyp	CONTROL HT µg de Hyp	TRATADOS 28 WT µg de Hyp	TRATADOS 28 HT µg de Hyp
73.5	83.0	107.3	78.3
79.9	92.1	131.4	79.5
87.0	72.2	97.3	141.3
88.0	101.5		140.5
90.5	88.1		

Tabla 3 Resultados de µg de hidroxiprolina (Hyp)

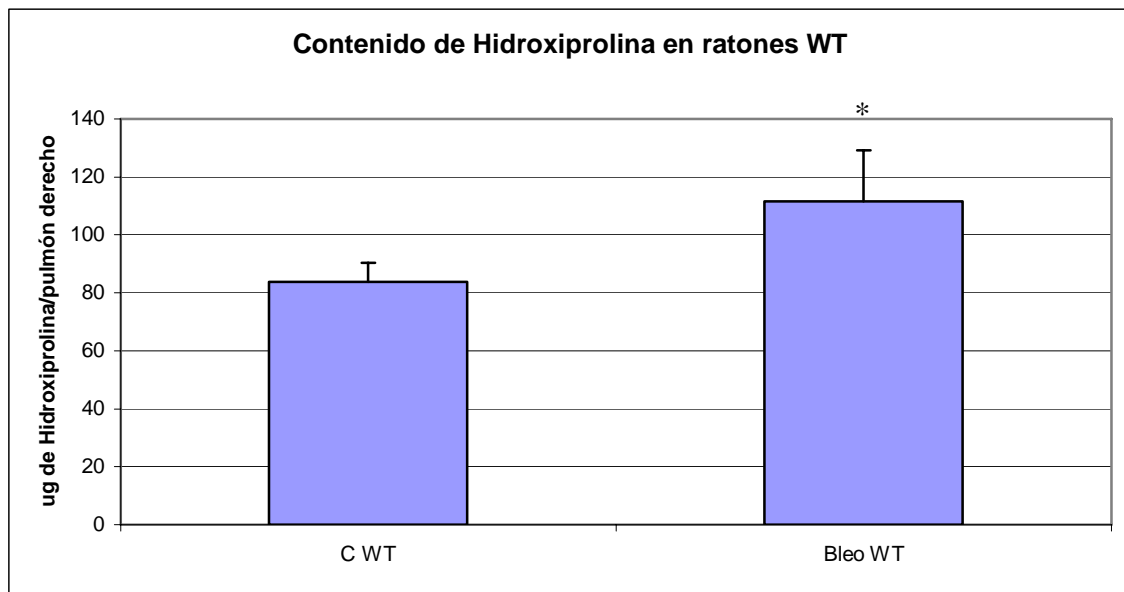


Figura 14. Comparación del contenido de Hidroxiprolina en ratones WT ($p < 0.05$ con respecto al control)

Como se observa en las figuras 14 y 16, en los ratones WT hubo un aumento significativo en el contenido de hidroxiprolina después de la instilación con bleomicina (83.7 ± 6.9 versus 112 ± 17.5 $P < 0.05$).

Por otro lado, en el caso de los ratones heterocigotos hubo un comportamiento heterogéneo en la respuesta a bleomicina. Como se observa en la tabla 3, 2 ratones presentaron un aumento en el depósito de hidroxiprolina semejante o superior al de los WT, mientras que otros dos no tuvieron incremento en este iminoácido.

El promedio de los resultados se muestra en la figura 15, dónde se puede observar que, en promedio, no hubo cambios significativos entre los ratones HT de uPARAP/Endo180 y los controles.

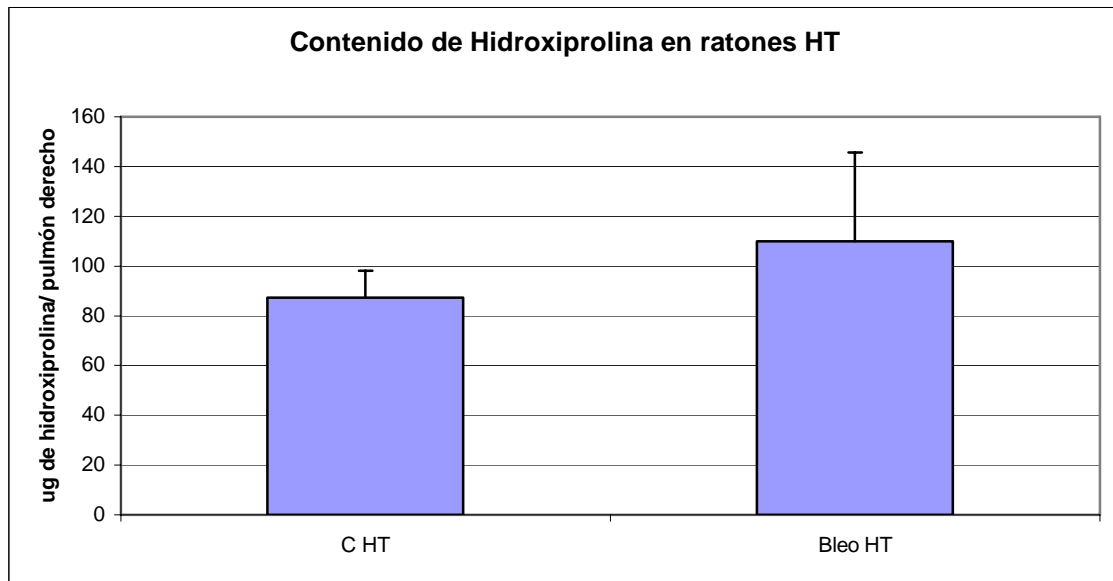


Figura 15. Comparación contenido de Hidroxiprolina en ratones Ht.

La figura 16 muestra los resultados individuales de cada uno de los ratones control e instilados con bleomicina tanto WT como HT. Esta figura muestra con claridad lo heterogéneo de los resultados obtenidos en los ratones heterocigotos de 28 días instilados con bleomicina, así también se muestra la diferencia en contenido de hidroxiprolina en ratones WT instilados con bleomicina a 28 días con respecto del grupo control WT.

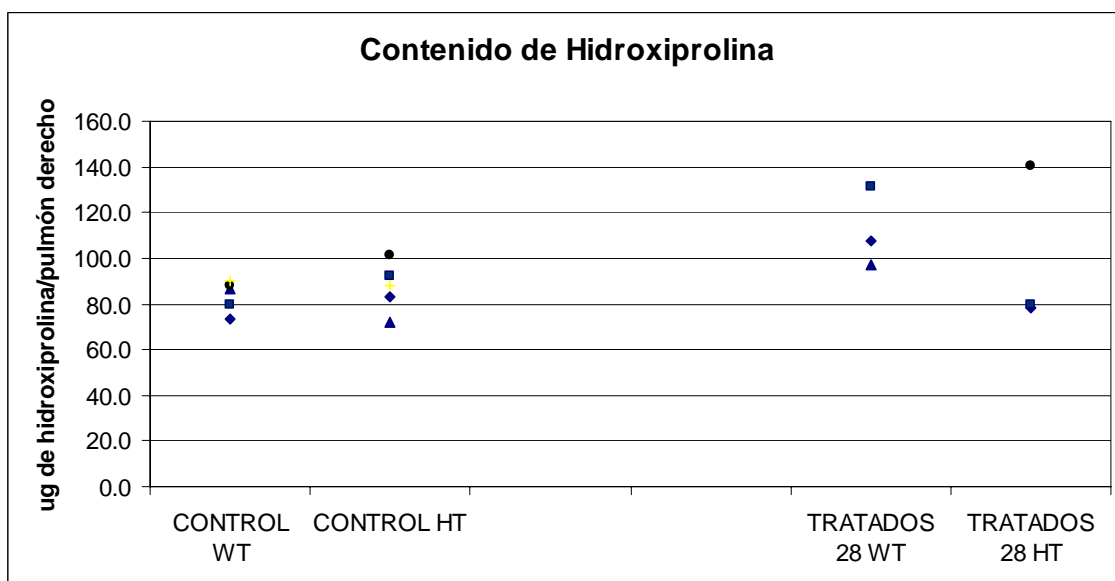


Figura 16. Comparación de ratones controles y tratados a 28 días de uPARAP/En180. Se puede observar un panorama general del comportamiento de los grupos.

8.- Discusión y conclusiones

La fibrosis pulmonar es la consecuencia final de un grupo heterogéneo de enfermedades intersticiales que se caracteriza por una acumulación excesiva de matriz extracelular, que resulta en una extensa desorganización bioquímica y estructural del pulmón, lo que interfiere con la función de intercambio gaseoso del mismo (34).

Existen numerosos estudios cuyo propósito es comprender los mecanismos involucrados en el metabolismo de las moléculas de matriz extracelular en fibrosis; sin embargo, la participación precisa de los diferentes mediadores en el recambio de matriz extracelular no se conoce con precisión (41). En este estudio nos enfocamos a analizar la participación de uPARAP/Endo180, un miembro de la familia de los receptores endocíticos de manosa, en el desarrollo de la fibrosis pulmonar en ratón inducida por bleomicina.

El ratón de laboratorio (*Mus musculus*) ha desempeñado un papel preponderante como organismo modelo para el estudio de los mecanismos involucrados en la etiología de las enfermedades humanas, ya que el 99% de los genes de ratón tienen homólogos en el humano (42).

La mutación sitio dirigida o sobreexpresión de genes específicos en el genoma del ratón ha abierto nuevas percepciones sobre la función biológica de las proteínas correspondientes, lo cual se puede correlacionar con cambios fenotípicos en el humano. En este contexto, el uso de ratones transgénicos, que va desde la inactivación de genes o su sobreexpresión en células específicas, ha permitido tener un mayor conocimiento sobre la biología de la fibrosis pulmonar (37,43,44).

El objetivo inicial del presente estudio comprendía la instilación con bleomicina de un ratón nulo para uPARAP con el propósito de comprender el papel de esta proteína en el desarrollo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina.

Se ha postulado que uPARAP/Endo180 participa en la internalización y posterior degradación lisosomal de colágena y se ha sugerido que este mecanismo constituye una

vía importante en la degradación de estas proteínas (26). Estudios en fibroblastos de ratón que tienen una mutación en el gen de uPARAP/Endo180 mostraron la eliminación completa de la endocitosis de colágena. Más aún estas células disminuyeron su adhesión a colágena así como la migración sobre colágena fibrilar (26).

Es importante señalar que la vía de degradación intracelular de colágena es novedosa ya que los mecanismos más estudiados de la degradación de moléculas de matriz extracelular se refieren a la acción extracelular de MMPs (41).

En el presente trabajo se evaluó el desarrollo de fibrosis inducida por bleomicina en ratones con genotipo uPARAP +/+ (WT) y uPARAP +/- (HT), debido a que el genotipo uPARAP -/- (KO) fue muy escaso entre las crías obtenido en nuestro bioterio. Adicionalmente, los pocos ratones con este genotipo no tuvieron crías. Es importante señalar, que no existen reportes sobre la posible infertilidad de estos ratones y éste sería un aspecto importante para analizar a futuro.

El análisis del contenido de hidroxiprolina en los pulmones de los ratones instilados, mostró un comportamiento heterogéneo de los ratones HT, mostrando que la mitad de los ratones presentaron un incremento en el contenido de hidroxiprolina, que además parece mayor que el observado en los ratones WT. Este resultado podría sugerir que la disminución de uPARAP juega un papel importante en la degradación intracelular de colágena y que, por lo tanto, su acumulación es mayor en el pulmón después del daño inducido por bleomicina.

Sin embargo, la otra mitad de los ratones HT no desarrolló fibrosis y su contenido de hidroxiprolina es semejante al de los controles. Este resultado puede atribuirse a un problema experimental en el proceso de instilación y la bleomicina pudo no haber llegado a los pulmones.

Este estudio preliminar sugiere que uPARAP puede estar desempeñando un papel en el recambio de colágena en la fibrosis pulmonar y que este trabajo podría complementarse con un mayor número de animales experimentales.

9.- Apéndice

Buffer de lisis para extracción de ADN (100 ml)

5 ml Tris pH 7.5, 1 M
10 ml EDTA pH 8, 0.5 M
2 ml NaCl₂, 5 M
0.5 ml DDT 1.0 M
10 ml SDS, 10%
Aforar a 100 ml con agua dde

Gel de agarosa al 1% (w/s)

0.2 gr Agarosa
20 ml de buffer TAE 1x
5 µg Bromuro de etidio.

Nota para el gel de agarosa al 2 % solo cambia de 0.2 gr a 0.4 gr.

TAE 50x

242 gr Trizma Base
57 ml Acido acetico glacial
100 ml de EDTA al 0.5 M
Agustar pH a 7.2 con El acido acetico
Aforar a 1 lt con agua dde.

Solución de Hidroxiprolina (100µg/ml)

5 mg de Hyp /50 ml de HCl (1mN)

Cloramina - T

1.4 gr de Cloramina T
20 ml de Agua dde
30 ml de Methyl cellosolve
50 ml de Buffer Tris pH6

Acido perclorico (3.15 M)

27 ml de HClO₄ al 70% / 100 ml

ρ- Dimetil aminobenzaldehido 20%

20 gr ρ-Dmabh / 100ml de methyl cellosolve.

10.- Referencias

1. Pardo, A. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. *Rev Inst Nat Enf Res Mex* 6:156-164, 1993
2. Aumailley M, Gayraud B. Structural and Biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76: 253-265, 1998.
3. Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays* 29:1001-10, 2007.
4. Franzke CW, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L. Collagenous transmembrane proteins : recent insights into biology and pathology. *J Biol Chem* 280; 4005-4008, 2005.
5. Veit G, Kobben B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem* 281: 3494-3504, 2006.
6. Chen M, O'Toole EA, Li YY, Woodley DT. Alpha2 beta 1 integrin mediates dermal fibroblast attachment to type VII collagen via a 158 amino-acid segment of the NC1 domain. *Exp Cell Res* 249: 231-239, 1999.
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Cell Junctions, cell adhesion and the extracellular matrix. En *Molecular Biology of the Cell*. 4^a ed. p. 949-1010. Garland Science, Nueva York & London. (2002).
8. Pardo A, Selman M. Matriz Extracelular. *Biología celular y molecular*. 1^a ed. (Jiménez LF & Merchant H eds.) p. 515-540. Pearson Educación, México. (2003).
9. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 200(4):423-8, 2003.
10. Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* 193: 1-21; 1998.
11. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in the aberrant fibrotic tissue remodelling. *Proc Am Thorac Soc* 3, 383-388, 2006.
12. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 19;1572(2-3):364-86, 2002
13. Weis W., Taylor M., Drickamer K., The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 163; 19-34, 1998.

14. Ezeowicz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular Characterization of the human macrophage mannose receptor; demonstration of multiple carbohydrate recognition – like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cell. *J Emp Med* 172; 1785-1794, 1990.
15. Ezeowicz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351; 155-158, 1991.
16. Chakraborty P, Das PK. Role of mannose/N-Acetylglucosamine receptor in blood clearance and cellular attachment of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 28; 55-62, 1988.
17. Schlesinger L.S. Macrophage Phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 150; 2920-2930, 1993.
18. Athamna A, Ofek I, Keisari Y, Markowitz S, Dutton GG, Sharon N. Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 59; 1673-1682, 1991.
19. Boskovic J, Arnold JN, Stilion R, Gordon S, Sim RB, Rivera-Calzada A, Wienke D, Isacke CM, Martinez-Pomares L, Llorca O. Structural model for the mannose receptor family uncovered by electron microscopy of Endo180 and the mannose receptor. *J Biol Chem* .31;281(13):8780-7, 2006.
20. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*. 272(24):6179-217, 2005.
21. Sheikh H, Yarwood H, Ashworth A, Isacke CM. Endo180, an endocytic recycling glycoprotein related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and macrophages and functions as a lectin receptor. *J Cell Sci*. 113 (Pt 6):1021-32, 2000.
22. Behrendt N, Jensen ON, Engelholm LH, Mørtz E, Mann M, Danø K. A urokinase receptor-associated protein with specific collagen binding properties. *J Biol Chem*. 275(3):1993-2002, 2000
23. Bailey L, Wienke D, Howard M, Knäuper V, Isacke CM, Murphy G. Investigation of the role of Endo180/urokinase-type plasminogen activator receptor-associated protein as a collagenase 3(matrix metalloproteinase 13) receptor. *Biochem J*. 1;363(Pt 1):67-72, 2002.

24. Howard MJ, Isacke CM., The C-type lectin receptor Endo180 displays internalization and recycling properties distinct from other members of the mannose receptor family. *J Biol Chem.* 277(35):32320-31, 2002.
25. Behrendt N, Ronne E, Dano K., Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains. *J Biol Chem.* 13;271(37):22885-94, 1996
26. Engelholm LH, List K, Netzel-Arnett S, Cukierman E, Mitola DJ, Aaronson H, Kjøller L, Larsen JK, Yamada KM, Strickland DK, Holmbeck K, Danø K, Birkedal-Hansen H, Behrendt N, Bugge TH. uPARAP/Endo180 is essential for cellular uptake of collagen and promotes fibroblast collagen adhesion. *J Cell Biol.* 160(7):1009-1015, 2003.
27. Madsen DH, Engelholm LH, Ingvarsen S, Hillig T, Wagenaar-Miller RA, Kjøller L, Gårdsvoll H, Høyer-Hansen G, Holmbeck K, Bugge TH, Behrendt N. Extracellular collagenases and the endocytic receptor, urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180, cooperate in fibroblast-mediated collagen degradation. *J Biol Chem.* 282: 27037-27045, 2007
28. Wienke D, MacFadyen JR, Isacke CM. Identification and characterization of the endocytic transmembrane glycoprotein Endo180 as a novel collagen receptor. *Mol. Biol. Cell.* 14: 3592-3604, 2003
29. Kjøller L, Engelholm LH, Høyer-Hansen M, Danø K, Bugge TH, Behrendt N. uPARAP/endo180 directs lysosomal delivery and degradation of collagen IV. *Exp Cell Res* 293: 106-116, 2004.
30. Isacke CM, van der Geer P, Hunter T, Trowbridge IS. p180, a novel recycling transmembrane glycoprotein with restricted cell type expression. *Mol Cell Biol* 10: 2606-2618, 1990.
31. Howard MJ, Isacke CM. The C-type lectin receptor Endo180 displays internalization and recycling properties distinct from other members of the mannose receptor family. *J. Biol. Chem* 277: 32320-32331, 2002.
32. East L, McCarthy A, Wienke D, Sturge J, Ashworth A, Isacke CM. A targeted deletion in the endocytic receptor gene Endo180 results in a defect in collagen uptake. *EMBO Rep.* 4(7):710-6. 2003

33. Rivera-Calzada A, Robertson D, MacFadyen JR, Boskovic J, Isacke CM, Llorca O. Three-dimensional interplay among the ligand-binding domains of the urokinase-plasminogen-activator-receptor-associated protein, Endo180. *EMBO Rep.* 4(8):807-12. 2003
34. Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci.* 7:d1743-1761, 2002
35. Selman M, Pardo A. Pathogenic mechanisms in the development of diffuse pulmonary fibrosis. *Braz J Med Biol Res.* (9):1117-26, 1996
36. Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(12):1534-8, 2002
37. Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Ramírez R, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Barrios R, Kala SV, Lieberman MW, Selman M. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 167(6):925-32. 2002
38. Cabrera Benítez S. Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar. *Rev Inst Nat Enf Res Mex* 19: 53-61. 2006.
39. Woessner J.F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *J Biochem Biophys* 93: 440-447, 1961.
40. D. W. Fawcett. Tratado de Histología. 12da. edición. Ed. Interamericana. 1995.
41. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in the aberrant fibrotic tissue remodelling. *Proc Am Thorac Soc* 3: 383-388, 2006.
42. The Knockout Mouse Project. *Nature Genetics.* 2004; 36: 921-924
43. 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
44. Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, Ramírez R, Jara P, D'Armiento J, Richards T, Selman M, Pardo A. Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 2324-2338, 2007.