



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de la respuesta inflamatoria pulmonar
inducida por bleomicina en ratones deficientes
en uPARAP/Endo 180

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A :

Miguel Angel Cid Soto

TUTORA :

Doctora Annie Pardo Semo

2008



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

ESTA TESIS FUE APOYADA POR EL MACROPROTECTOR: SDI.PTID.05.6
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

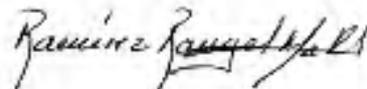
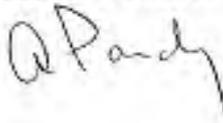
Votos Aprobatorios

Act. Mauricio Aguilar González
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Análisis de la respuesta inflamatoria pulmonar inducida por bleomicina en ratones deficientes en uPARAP/Endo 180

realizado por Cid Soto Miguel Ángel con número de cuenta 0-9906264-8 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr. Jorge Antonio García Álvarez	
Propietario	M. en C. María de los Remedios Josefina Ramírez Rangel	
Propietario Tutora	Dra. Annie Pardo Serrio	
Suplente	M. en C. Beatriz Rodarte Murguía	
Suplente	Ing. Bioquímico Héctor Quezada Pablo	

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 16 de abril de 2008

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA


DR. ZENÓN CANO SANTANA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

AGRADECIMIENTOS

Empiezo por agradecer a mis padres María de Lourdes Soto Pérez y Miguel Angel Cid Cervantes, a mi hermano Héctor Emmanuel Cid Soto por todo su amor, apoyo y comprensión que me han brindado, no solo en este momento sino a lo largo de toda mi vida. Ustedes me han dado todo lo que necesito y aún más. Muchas gracias los quiero mucho.

A mi abuelita Hermelinda Pérez porque ha sido muy buena conmigo, me ha apoyado en todo y me ha dado todo su amor toda mi vida es algo que siempre agradeceré, sí mismo a mis abuelitos Manuel Soto Prisciliano Cid y Elena cervantes que aunque ya no están físicamente siempre van a estar hay, a ellos también les doy las gracias todo lo que me ayudaron y me pudieron otorgar siempre.

A mis tíos Antonio, Eduardo, Ignacio, Jesus, Julio, Francisco, Marco, Miguel, Raúl, Roberto, Ricardo, Serge, a mis tías Rosa, Carmen, Helena, Eugenia, Guadalupe, Victoria, Dolores, Sonia, María Luisa, Ester, Noemi, Angelica, Arcelia, Beatriz, Rocío, por todo el apoyo, la ayuda, las enseñanzas y las cosas buenas que me han dado en todo este tiempo.

A mis primos Arturo, Ignacio, Servando, Karol, Mariana, Lorena, Priscila, Rubi, Marbella Julio, Marco, Diego, Mauricio, Alexis, Astrid, Ethan, Michelle por estar siempre conmigo, por su apoyo, por compartir cosas padres y se que siempre van a estar hay.

A Tania por su compañía, por su apoyo incondicional y comprensión en todo momento a lo largo de este tiempo.

A mi asesora Dra. Annie Pardo por permitirme ser parte de este grupo de trabajo y por todo el apoyo otorgado en todos los aspectos.

Al Dr. José Cisneros por su tiempo, gran ayuda y apoyo en el tiempo que realicé este trabajo

A Javier Gaytán por su ayuda ya que también e parte de este trabajo.

A los miembros del laboratorio de Bioquímica de la Facultad de ciencias UNAM profesores y compañeros por su compañía apoyo y compañía.

A los miembros del equipo e trabajo que me ayudaron y apoyaron en el INER Dr. Selman, Martha, Carina, Víctor, Ileana, Marco, Sandra.

A mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo durante toda la carrera Yire, Javier, Adrián, Sol, Pablo, Silvia, Karla, Jimena, Abigail, a todos gracias.

A mis Sinodales y profesores Remedios Ramírez y Jorge García que me ayudaron en cada momento en cualquier cosa que se pudiera necesitar. A mis sinodales Beatriz Rodarte y Héctor Quezada por el conocimiento el tiempo que dedicaron a este trabajo.

ÍNDICE	pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
➤ Matriz extracelular.	3
➤ La Familia de las metaloproteasas de matriz.	11
➤ La familia de receptores manosa.	13
➤ Receptor activador del plasminógeno urocinasa asociado a la proteína Endo 180 (uPARAP/Endo 180).	15
➤ Fibrosis Pulmonar.	17
➤ Inflamación.	20
➤ El modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.	29
OBJETIVO	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
➤ Genotipificación de ratones.	31
➤ Modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.	34
➤ Sacrificio de ratones y Lavados Bronquio alveolares LBA.	34
➤ Determinación de la concentración de hidroxiprolina.	35
➤ Procesamiento histológico.	35
➤ Estadística.	36
RESULTADOS	37
➤ Caracterización genética.	37
➤ Lavado bronquio-alveolar.	40
➤ Concentración de Hidroxiprolina.	43
➤ Histología.	45
DISCUSIÓN	48
REFERENCIAS	5

RESUMEN

Los organismos multicelulares están formados por diversos tipos de tejidos y en la mayor parte de ellos, sus células interactúan con la matriz extracelular (MEC), que es una red compleja de macromoléculas que se encuentra fuera de las células entre los límites epitelial y endotelial. La MEC participa de una manera determinante en procesos celulares tales como desarrollo, migración, diferenciación, proliferación y apoptosis, entre otros. Está conformada por una gran variedad de moléculas, que incluyen, entre otras, a la familia de las colágenas, las fibras elásticas, la fibronectina, los proteoglicanos y glicosaminoglicanos.

Las metaloproteasas de matriz (MMP) son las principales enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular y tienen un papel central en diversos procesos fisiológicos como la morfogénesis, angiogénesis, inflamación y remodelación ósea, además participan en procesos patológicos como la artritis reumatoide, invasión tumoral o enfermedades fibrosantes.

uPARAP/Endo 180 es una proteína transmembranal miembro de la familia de receptores de manosa que se une directamente a varios tipos de colágena, es parte de un complejo trimolecular con pro-uPA y uPAR el cuál colabora con las MMPs en procesos de degradación de colágena.

Se ha propuesto, basado en estudios celulares *in vitro* e inmunohistoquímica que la degradación intracelular de colágena mediada por uPARAP/Endo180 es una vía importante en el recambio de colágena en procesos malignos. uPARAP/Endo180 actúa como un receptor constitutivamente endocítico que desempeña un papel fisiológico mediando la remodelación de colágena a través de su entrega a compartimentos lisosomales degradativos.

El objetivo de este estudio fue conocer los mecanismos en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y analizar el papel que juega uPARAP/Endo 180 en este proceso patológico.

Se analizó la respuesta inflamatoria en ratones silvestres (WT) uPARAP/Endo 180 +/+ y se comparó con la de ratones heterocigotos (HT) uPARAP/Endo 180 +/- . A los siete días después de la instilación con bleomicina, tanto los ratones HT como los ratones WT presentan una respuesta inflamatoria similar, esto al analizar y comparar el conteo diferencial de células inflamatorias que se realizó a los lavados bronquio alveolares obtenidos. En lo que respecta a la concentración de colágena, no se encontró una diferencia significativa entre los dos genotipos. El análisis histológico mostró que no hay diferencias entre los dos genotipos durante la respuesta inflamatoria a los 7 días después de la instilación.

Para conocer más del papel que tiene uPARAP/Endo 180 en la respuesta inflamatoria, así como en la fibrosis pulmonar se deberá analizar en un futuro con ratones que sean totalmente carentes de uPARAP/Endo 180, es decir organismos (KO)

Abreviaturas usadas

(MEC) matriz extracelular; (MMP) metaloproteasas de matriz; (uPARAP/Endo 180) Receptor activador del plasminógeno urocinasa asociado a la proteína endo 180; (uPA) activador del plasminógeno urocinasa; (WT) wild type; (HT) heterócigo; (KO) *Knock out*; (FACITs) *fibril-associated collagens with interrupted triple hélix*; (TIMP) inhibidores tisulares de metaloproteasas; CBX, carbenoxolone; (MR) receptor de manosa; (CTLDs) dominios tipo lectina; (Cys MR) dominio rico en sisteina; (FNII) dominio de fibronectina; (EIP) enfermedades intersticiales pulmonares; (NII) neumonías intersticiales ideopáticas; (FPI) fibrosis pulmonar ideopática; (PIP2) fosfatidilinositol-4,4-bifosfato; (IP3) inositol-1.4.5-trifosfato (IP3); (DAG) diacilglicerol; (PBS) buffer salino fosfatado; (CBX) *carbenoxolone*; (dde) agua destilada desionizada

INTRODUCCIÓN

Matriz extracelular

Los organismos multicelulares están formados por diversos tipos de tejidos y en la mayor parte de ellos, sus células interactúan con una matriz extracelular (MEC). La MEC comprende el material que se encuentra fuera de las células, entre los límites epitelial y endotelial y su abundancia en los animales es muy variable en los diferentes órganos. La MEC forma parte de algunas estructuras como la cornea, los ligamentos, las redes reticulares en los órganos, los vasos sanguíneos, la membrana alveolar a través de la que se realiza el intercambio gaseoso en el pulmón. Asimismo, puede calcificarse y formar estructuras como los huesos o dientes, o puede tener una organización parecida a cordones como en el tendón, al cual le da su gran fuerza mecánica. La MEC desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares y en la forma de sus órganos y cuerpo. Por otro lado, la MEC desempeña un papel activo en la regulación de procesos básicos de las células que tienen contacto con ella, ejerciendo una función moduladora del crecimiento celular, la migración, proliferación y diferenciación celular, así como de la apoptosis (1-2).

La MEC está conformada por una gran variedad de moléculas que interactúan entre sí, generando una estructura tridimensional a la cual las células se adhieren por receptores específicos o ligandos. Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular incluyen entre otras, a la familia de las colágenas, que son responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, la elastina que le otorga la flexibilidad y elasticidad, proteínas de adhesión como fibronectinas y lamininas y los proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad. Además, la MEC es un sitio de almacenamiento de factores de crecimiento polipeptídicos. En condiciones fisiológicas, hay un equilibrio dinámico de síntesis y degradación de los componentes de la matriz. Una remodelación desequilibrada de la matriz se ha asociado con diferentes procesos patológicos, como por ejemplo la artritis reumatoide, la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar y la invasión de algunos cánceres (1).

Moléculas que constituyen a la MEC

La superfamilia de las colágenas

Las proteínas colagénicas son el componente principal de las matrices extracelulares y son las proteínas más abundantes en los animales, constituyen una tercera parte de su masa proteica. Las colágenas son una clase heterogénea de moléculas que son codificadas por una superfamilia de genes relacionados. Se definen como proteínas estructurales de la matriz, cuya secuencia se caracteriza por repeticiones de unidad de tres aminoácidos Gly, X, Y, los cuales se han identificado en ciertos dominios de otras proteínas, incluidos las colectinas, la forma asimétrica de la acetilcolinesterasa, la ficolina, la proteína A del surfactante pulmonar y ciertos receptores de macrófagos. Se han identificado diversos tipos de colágenas en vertebrados, los cuales tienen en común uno o más dominios con una estructura de triple hélice (4).

En las colágenas intersticiales, más del 95% de su estructura es de triple hélice, mientras que en otras es solo una fracción de su masa molecular. La triple hélice consiste en tres cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene la forma de una hélice que gira hacia la izquierda con aproximadamente 3.3 residuos de aminoácidos por cada vuelta. Estas tres cadenas helicoidales están enrolladas con un giro hacia la derecha sobreponiéndose una encima de la otra, para producir una estructura de triple hélice. Este tipo de estructura helicoidal es posible, porque cada tercer aminoácido de los que está constituida esta proteína es una glicina, el más pequeño de los aminoácidos, el cual está en el centro de la hélice. En la estructura repetitiva Gly-X-Y de la triple hélice, cerca de 30% de las posiciones X y Y están ocupadas por prolina e hidroxiprolina, que son aminoácidos que le otorgan rigidez y estabilidad a la molécula (Figura 1) (1,4).

Desde la síntesis de la molécula de colágena, hasta su depósito en el espacio extracelular, ocurren sucesos postraduccionales, uno de los más destacados es la formación de hidroxiprolina, un proceso que ocurre en aproximadamente la mitad de las prolinas. La enzima responsable de esta hidroxilación, la hidroxilasa de prolina, requiere varios cofactores para su acción, como el ácido ascórbico o vitamina C, lo que explica la insuficiente curación de las heridas que se observa en pacientes con escorbuto por la carencia de vitamina C. Algunos residuos de lisina son también hidroxilados por una enzima específica y el producto es la hidroxilisina. La lisina y la hidroxilisina participan

en la formación de entrecruzamientos covalentes entre las cadenas y las moléculas de colágena y sirven como sitios de unión para los carbohidratos, cuando los entrecruzamientos no se dan rápidamente, las fibras de colágena no tienen la fuerza mecánica necesaria para su función.

Las fibras de colágena de un mismo organismo, están hechas de distintos tipos de moléculas de colágena y algunos tipos que no forman fibras. A los tipos de colágena se les asigna un número romano que refleja el orden cronológico en el que fueron descubiertos. Sus cadenas polipeptídicas individuales se llaman cadenas alfa y están numeradas con números arábigos para cada tipo genético de colágena. Los vertebrados tienen 27 tipos de colágenas, con 42 cadenas α distintas (Tabla 1). La mayoría de las colágenas forman ensambles supramoleculares como fibras o redes, con esta característica, la familia de las colágenas puede ser dividida en varias subfamilias de acuerdo al tipo de ensamble y a otras características (2).

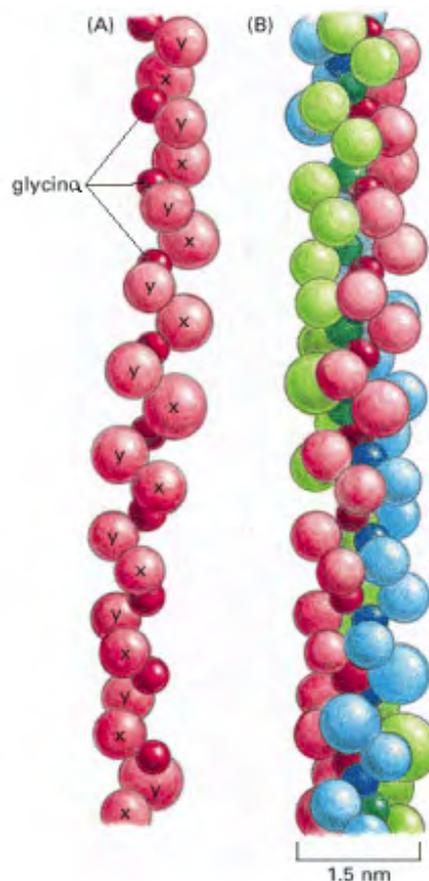


Fig 1. Esquema representativo de la estructura de una molécula de colágena. (A) Modelo de una fracción de la cadena α , en la cual cada aminoácido está representado por una esfera. (B) Modelo de una molécula de colágena en triple hélice, cada cadena α se muestra en un color diferente. (De Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4a. ed. Garland Science, 2002, realizado a partir del modelo de B.L. Trus)

Las colágenas fibrilares o formadoras de fibras, son un grupo formado por las colágenas tipo I, II, III, V, XI, XVI y XXVII. La similitud estructural entre las colágenas fibrilares se refleja a nivel genético, su ADN se caracteriza por mostrar un alto grado de conservación en sus exones e intrones (2,3). La conservación de esta estructura genética puede ser rastreada desde los mamíferos hasta especies evolutivamente muy distantes como serían las esponjas o los erizos de mar. Cuando son secretadas al espacio extracelular, se organizan en polímeros ordenados denominados fibrillas de colágena, de entre 10 y 300 nm de diámetro y de varios cientos de micrómetros de longitud en tejidos maduros. La colágena tipo I es la proteína estructural más abundante en vertebrados, se encuentra en piel, tendón, ligamentos, cornea y hueso constituye entre 80 y 99% de la colágena total (1).

Otra subfamilia de colágenas que están asociadas a fibras, son las denominadas FACITs (*fibril-associated collagens with interrupted triple helix*) ellas ambientan la superficie de las fibrillas de colágena, son mediadoras de las interacciones con otras proteínas de matriz, participan en la unión de las fibrillas y de otros componentes de matriz extracelular. La subfamilia de las FACITs está constituida por las colágenas tipo IX, XII, XIV, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI (4).

Otro grupo de colágenas son las que participan en la formación de láminas o membranas proteicas que rodean tejidos u organismos, como ejemplo, están las membranas basales, cutículas de gusanos y esqueletos orgánicos de esponjas, los tipos de colágenas que componen este grupo son las IV, VIII y X, aunque hay autores que las dividen en colágenas de membranas basales (tipo IV) y las de cadena corta (tipo VIII y X).

La colágena tipo VI es llamada íntima, forma filamentos en rosario y está presente en la mayoría de las matrices extracelulares. Contiene aminoácidos que tienen función en la interacción de componentes de matriz con receptores celulares del tipo de las integrinas. La red de filamentos de colágena tipo VI se encuentra junto con fibras clásicas de colágena puede desempeñar el papel de interfase entre la red de fibras y células (1,4).

La colágena tipo VII es un homotrímero de cadenas alfa 1 y su distribución tisular se correlaciona con la de fibras de anclaje que son estructuras fibrilares especializadas en la lámina subbasal, se ensambla en dímeros antiparalelos que se superponen cada 60nm, las fibras de anclaje que se forman sirven para que descansen algunos epitelios escamosos estratificados, estas estructuras se unen por sus extremos a las membranas

basales epiteliales, la red resultante atrapa físicamente a las fibras de colágena intersticial y contribuye a la adhesión de las membranas basales del epitelio al estroma, son muy abundantes en la piel (1).

Existen otros tipos de colágenas de las cuales se desconoce su función (Tabla 1).

TIPO	FORMA	CARACTERISTICAS	GEN (ES)
I	Formadora de fibras	Se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón y la córnea. Es sintetizada por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos.	<i>COL1A1, COL1A2</i>
II	Formadora de fibras	Se encuentra sobre todo en el cartílago, pero también se presenta en la córnea embrionaria y en la notocorda, en el núcleo pulposo y en el humor vítreo del ojo. Es sintetizado por condroblastos	<i>COL2A1</i>
III	Formadora de fibras	Abunda en el tejido conjuntivo laxo, en las paredes de los vasos sanguíneos, la dermis de la piel y el estroma de varias glándulas. Es sintetizado por las células del músculo liso, fibroblastos, glía.	<i>COL3A1</i>
IV	Reticular	Forma la lámina basal que subyace a los epitelios. Es sintetizada por las células epiteliales y endoteliales.	<i>COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6</i>
V	Formadora de fibras	Presente en la mayoría del tejido intersticial. Se asocia con la colágena tipo I	<i>COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL5A4</i>
VI	Formadora de filamentos en rosario	Presente en la mayoría del tejido intersticial. Sirve de anclaje a las células en su entorno. Se asocia con la colágena tipo I.	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>
VII	Formadora de fibras de anclaje	Se encuentra en la lámina basal	<i>COL7A1</i>
VIII	Formadora de redes hexagonales	Presente en algunas células endoteliales	<i>COL8A1, COL8A2</i>
IX	Asociada a fibras (FACIT)	Se encuentra en el cartílago articular maduro. Interactúa con la colágena tipo II	<i>COL9A1, COL9A2, COL9A3</i>
X	Formadora de redes hexagonales	Presente en cartílago hipertrófico y mineralizado	<i>COL10A1</i>
XI	Formadora de fibras	Presente en cartílago. Interactúa con las colágenas tipo II y IX	<i>COL11A1, COL11A2</i>
XII	Asociada a fibras (FACIT)	Presente en tejidos sometidos a altas tensiones como los tendones y ligamentos. Interactúa con los tipos I y III	<i>COL12A1</i>
XIII	Con dominio transmembranal	Es ampliamente encontrada como una proteína asociada a la membrana celular. Interactúa con las colágenas tipo I y III	<i>COL13A1</i>
XIV	Asociada a fibras (FACIT)		<i>COL14A1</i>
XV	?		<i>COL15A1</i>
XVI	Relacionada a FACIT		<i>COL16A1</i>
XVII	Con dominio transmembranal		<i>COL17A1</i>
XVIII	?		<i>COL18A1</i>
XIX	Relacionada a FACIT		<i>COL19A1</i>
XX	Relacionada a FACIT		<i>COL20A1</i>
XXI	Relacionada a FACIT		<i>COL21A1</i>
XXII	Relacionada a FACIT		<i>COL22A1</i>
XXIII	Con dominio transmembranal		<i>COL23A1</i>
XXIV	Formadora de fibras		<i>COL24A1</i>
XXV	Con dominio transmembranal		<i>COL25A1</i>
XXVI	Relacionada a FACIT		<i>COL26A1</i>
XXVII	Formadora de fibras		<i>COL27A1</i>

Tabla 1. La superfamilia de las colágenas (De: Myllyharju J et al,(8) 2004.)

Fibras elásticas

Las fibras elásticas desempeñan un papel fundamental en la estructura de las matrices intersticiales y en la organización tisular. Dependiendo del tejido, las matrices intersticiales otorgan flexibilidad y resistencia a los procesos de estiramiento, estas fibras se encuentran en grandes cantidades en tejidos en los que la extensibilidad reversible es importante para su función como en el pulmón o la piel. Las fibras elásticas están conformadas por una compleja estructura que contiene elastina, la proteína responsable de la elasticidad y las microfibrillas.

La elastina es la proteína que le otorga las propiedades elásticas a distintos tejidos en los vertebrados. Está conformada por aproximadamente 750 residuos de aminoácidos, la mayoría de ellas son hidrofóbicas. Su conformación presenta prolina y glicina, como la colágena, pero a diferencia de ella, no está glicosilada, presenta un bajo contenido de hidroxiprolina y carece completamente de hidroxilisina.

La elastina es una proteína que se sintetiza en forma soluble, se modifica postraduccionalmente, se empaqueta y se transporta a sitios específicos de la superficie celular, donde se producen las uniones cruzadas y el ensamble final para la formación de fibras, la elastina está constituida en su mayor parte por dos tipos de segmentos cortos que se alternan a lo largo de la cadena polipeptídica: segmentos hidrofóbicos que son los responsables de las propiedades elásticas de la molécula y los segmentos de hélice α , ricos en alanina y lisina que forman puentes cruzados entre moléculas adyacentes.

Las fibras elásticas también están compuestas por las microfibrillas, formadas por varias glucoproteínas distintas, entre ellas la fibrilina que parece jugar un papel esencial en el mantenimiento de la integridad de las fibras elásticas. Otras moléculas que conforman a las microfibrillas, son la fibrilina, la glucoproteína asociada a microfibrillas, una glucoproteína con actividad de aminoxidasa y la enzima lisiloxidasa.

El componente microfibrillas dirige la morfogénesis de las fibras elásticas actuando como el andamio sobre el cual se depositan las moléculas de elastina (1).

Fibronectina

Son una familia de glucoproteínas multifuncionales que pueden estar formando parte de la matriz extracelular o circulando en el plasma, están constituidas por dos subunidades polipeptídicas de 230 y 250 kDa que se encuentran ligada por uniones disulfuro.

Los más de 20 miembros de la familia derivan de un gen estructural único, la estructura de la fibronectina esta fuertemente conservada en la escala evolutiva y es repetitiva, con tres unidades básicas llamadas homologías tipos I, II y III, las cuales constituyen el esqueleto de la proteína, estas homologías están involucradas en la actividad de unión a fibrina, heparina y colágena. La fibronectina desempeña un papel importante en la formación de matriz extracelular, en la adhesión y migración celular, en la opsonización y en la cicatrización de las heridas, entre otras.

La fibronectina extracelular actúa como sustrato para la adhesión celular durante la embriogénesis y la organogénesis, participa en la gastrulación, en la migración de células de la cresta neural, en la diferenciación de las células hematopoyéticas y en el desarrollo cardíaco y pulmonar entre otras, las células interactúan con la fibronectina vía un receptor de membrana.

Existe un tipo de fibronectina llamada fibronectina plasmática, la cual esta implicada en la opsonización, con la capacidad que tiene la fibronectina de unirse a fibrina, restos tisulares y bacterias, estas tienen implicaciones en los mecanismos de defensa contra patógenos. También parece desempeñar un papel en la reparación de los tejidos y la cicatrización de las heridas, la fibronectina y la fibrina se conservan en las áreas lesionadas donde forman una matriz provisional que favorece el ensamblaje del tejido de granulación. (1).

Glicosaminoglicanos y proteoglicanos

Los glicosaminoglicanos son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas, cuyas unidades están representadas por disacáridos repetidos, uno de los dos azúcares es siempre un aminoazúcar: N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina, por lo general sulfatado; y el otro azúcar es un ácido urónico o galactosa. Los glicosaminoglicanos presentan una carga neta negativa debida a la presencia de grupos sulfato o carboxilo en la mayoría de los residuos glucosídicos. En función de dichos residuos glucosídicos, el

tipo de enlace entre ellos y el número y localización de los grupos sulfato, se pueden distinguir cuatro grupos principales de glicosaminoglicanos:

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

Los proteoglicanos presentan un conjunto peculiar y diverso de proteínas, cuyo rasgo estructural es que todos están conformados por una proteína central, a la cual se unen covalentemente uno o varios glicosaminoglicanos, lo que permite incluir dentro de esta familia a una gran variedad de moléculas con un amplio espectro de relación carga/masa. Debido a esta diversidad estructural, los proteoglicanos tienen una variedad de funciones biológicas como son: la participación en el tráfico de moléculas y células a través de la matriz, la unión a factores de crecimiento para aumentar o disminuir su actividad, la señalización química entre células, la regulación de las actividades de otras proteínas de secreción inmovilizándolas, bloqueándolas, o almacenándolas para su liberación posterior, protegiéndolas así de la degradación proteolítica y alterando o concentrando a la proteína para hacer más efectiva su exposición a receptores de superficie. Los proteoglicanos pueden encontrarse también en el interior de la célula o asociadas a la membrana plasmática como correceptores, es decir, se unen a ligandos como factores de crecimiento y los presentan a sus receptores específicos, o colaboran en la unión de la célula a la matriz. La síntesis y degradación de proteoglicanos son procesos muy dinámicos y altamente regulados. Alteraciones en su metabolismo dan origen a anomalías genéticas letales o enfermedades como esclerodermia, asma, enfisema, enfermedades fibrosantes y mesoteliomas (2).

La familia de las metaloproteasas de matriz

Las metaloproteasas de matriz (MMP) son las principales enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular y desempeñan un papel central en diversos procesos fisiológicos como la morfogénesis, angiogénesis e inflamación. Esta familia de endopeptidasas comparte un grupo de dominios entre los que se encuentran:

- a) Un dominio propeptídico responsable de la falta de actividad de las proenzimas. En este dominio existe un residuo de cisteína que forma un enlace coordinado con el Zn^{2+} , presente en el dominio catalítico, y enmascara de esta manera al sitio activo de las proenzimas o zimógenos.
- b) Un dominio catalítico esencial para la actividad enzimática y que contiene el sitio de unión Zn^{2+} y a Ca^{2+} .

- c) Una secuencia rica en prolina que funciona como bisagra y un sitio carboxilo-terminal con un dominio tipo hemopexina (9).

Las MMPs se pueden clasificar en diferentes subfamilias que incluyen a las colagenasas, gelatinasa, estromelinas y las metaloproteasas tipo membrana. Las colagenasas rompen la región triple helicoidal de las colágenas. Entre ellas se encuentran la MMP-1 llamada colagenasa intersticial, o la MMP-8 también llamada colagenasa de neutrófilos, la MMP-13 ó colagenasa 3 clonada de un carcinoma humano mamario (5, 9).

La subfamilia de las gelatinasas degradan colágena tipo IV, principal constituyente de membranas basales, fibronectina y elastina. Se han caracterizado dos miembros de este subgrupo, la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9). Ambas enzimas contienen un dominio adicional parecido a fibronectina y la gelatinasa B contiene también una región en el carboxilo-terminal que es semejante a la cadena 2 de la colágena tipo V.

La subfamilia de estromelinas tiene una amplia especificidad de sustratos que incluye a la parte proteica de los proteoglicanos, a la fibronectina y la laminina. Varias enzimas se han incluido en este grupo e incluyen a la estromelina 1 (MMP-3), la estromelina 2 (MMP-10) y la estromelina 3 (MMP-11). Las metaloproteasas de membrana (MT-MMP), se han determinado seis enzimas. Este grupo de enzimas se caracteriza por la presencia de un dominio transmembranal que es una extensión terminal rica en residuos hidrofóbicos, se ha propuesto que estas proteínas son responsables del procesamiento de varias proteínas en la superficie celular (9).

La regulación de las MMP ocurre en varios niveles, tanto en el interior de la célula como extracelulares y la actividad enzimática es el resultado final de una compleja serie de procesos que incluye la expresión del gen, la activación del zimógenos y la inhibición enzimática en el espacio extracelular (1,5,9).

La expresión genética es regulada por una variedad de citocinas, tales como factores de crecimiento y mediadores inflamatorios, los cuales pueden incrementar o disminuir la síntesis de la enzima en una célula específica. El otro nivel de regulación del zimógeno puede alcanzarse por agentes sulfhidrilo con oxidantes u otras proteasas.

Los principales inhibidores fisiológicos de las MMP son una familia de inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP), de los cuales se han identificado cuatro tipos denominados TIMP-1, 2, 3, 4. Los TIMPs forman complejos de alta afinidad con las

formas activas de MMP e inhiben su actividad enzimática a través de una interacción no covalente.

La participación de las MMPs en procesos fisiológicos está bien documentada en procesos como la angiogénesis, remodelación ósea etc. Las MMP participan además en la respuesta inflamatoria y desempeñan un papel importante en el desarrollo de numerosos procesos patológicos que incluyen artritis reumatoide, invasión tumoral, enfermedades fibrosantes, enfisema y daño pulmonar (1, 5, 27, 28, 29, 30)

Familia de receptores manosa

La familia de receptores manosa es un subgrupo de la superfamilia lectina tipo C y comprende cuatro miembros: el receptor manosa (MR), el receptor tipo-M fosfolipasa A₂ (PLA₂R), el DEC-205/gp200-MR6 y el receptor uPARAP/Endo180 (Figura 2).

Estos receptores son glucoproteínas transmembranales que comparten una organización estructural común, presentan un dominio rico en cisteínas en el extremo N-terminal, un dominio de fibronectina tipo II, seguido de 8 a 10 dominios lectina tipo C (CTLDs). Estos receptores utilizan su propiedad 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 colágena al interior celular y en el sistema inmune (7).

uPARAP/Endo180 juega una función clave en remodelación de matriz extracelular y migración celular, su expresión se encuentra elevada en distintos tipos de endotelios tumorales (6).

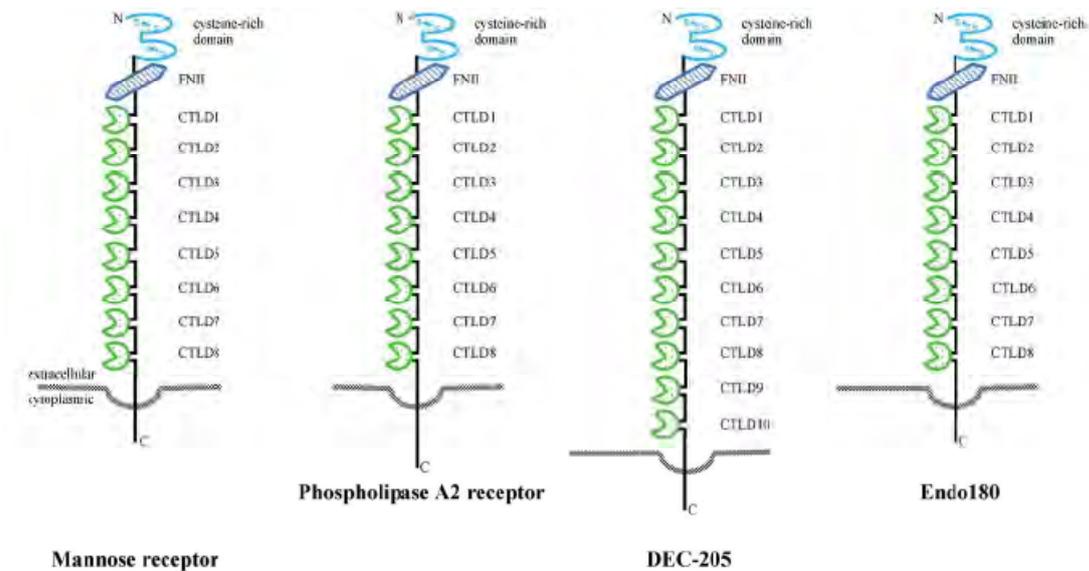


Fig 2. Familia de receptores manosa. Representación esquemática de los dominios estructurales de la familia de receptores manosa. El dominio rico en cisteína, el dominio de fibronectina de tipo II y los dominios de lectina tipo C. (De: East L. *Biochimica et biophysica Acta*. 1572, 2002).

Dominios estructurales de la Familia de receptores manosa

El dominio rico en cisteína (Cys-MR) revela una región N-terminal la cual no presenta homología a los dominios en otras proteínas, se ha demostrado que el Cys-MR se une a las cadenas de carbohidratos sulfatados de las hormonas pituitarias, de la lutropina, y de la tirotropina, una hormona estimulante de la tiroides. Se ha propuesto que el Cys-MR. tiene un papel en la separación rápida de la lutropina del suero en las células endoteliales hepáticas, esto es importante para mantener detenida la hormona *in vivo*. También se ha propuesto que Cys-MR puede ayudar a dirigir las células del MR hacia centros germinales durante la inmunorespuesta. Dentro de la familia del receptor manosa se presenta una similitud en el dominio del receptor manosa, del 25-30% de igualdad en la secuencia (6,7).

El dominio de fibronectina (FNII) es el más conservado de todos los dominios con una secuencia 44-63% idéntica entre los miembros de la familia. Se cree que este dominio, en todos los receptores tiene la propiedad de adherir colágena. Como ejemplo: en células de tipo WT de PLA₂R hay una adhesión a colágena tipo I y IV, esta propiedad se pierde en células en las cuales el dominio FNII y el de cisteína han sido suprimidos. En uPARAP/Endo 180, se ha demostrado una asociación trimolecular en la superficie celular de este receptor con uPAR y pro-uPA

Los dominios lectina tipo C son característicos en la familia de receptores manosa, ya que presentan múltiples dominios lectina tipo C o también pueden ser dominios lectina tipo C reconocedores de carbohidratos, sin embargo algunos de estos dominios no tienen actividad de lectina, por lo que se les llama dominios similares de lectina tipo C (CTLD) (C-type lectin-like domines). Cada miembro de receptores manosa contiene múltiples CLTDs pero solo el MR y uPARAP/Endo 180 tienen el dominio lectina tipo C funcional, el cual tiene los aminoácidos requeridos para la coordinación de Ca^{2+} y la adhesión de azúcares, otros CLTDs como el CLTD5 de PLA_2R ha evolucionado para mediar Ca^{2+} independiente en interacciones proteína/proteína (6,7).

Receptor activador del plasminógeno urocinasa asociado a la proteína endo 180 (uPARAP/Endo 180)

uPARAP/endo180 es una proteína transmembranal miembro de la familia de receptores manosa, el receptor se une directamente a varios tipos de colágena a través de interacciones regidas por el dominio FNII, uPARAP/Endo180 también tiene una actividad de unión a carbohidratos mediada por el dominio tipo lectina e interactúa con uPAR en un proceso que implica trasducción de señal y migración celular (8,11,13).

Endo 180 fue identificado como un receptor endocítico de 180 kDA expresado en fibroblastos. Diversos estudios demostraron que en la mayoría de los tejidos que tienen uPARAP/Endo 180, hay una elevada expresión en el embrión y en el recién nacido, en condrocitos en áreas activas de depósito de cartílago y en tejidos que presentan osificación. Se han identificado varios ligandos que interactúan con uPARAP/Endo 180 (7).

Endo 180 tiene en común con el MR, un dominio lectina tipo C funcional, el cual puede ser mediado por CTLD2 con una posible interacción de CTLD1. uPARAP/Endo 180 reconoce colágena, esto a causa del dominio FNII. Se ha reportado que uPARAP/Endo 180 interactúa con dos componentes extracelulares del sistema de proteasas, la MMP-13, que también es llamada colagenasa 3 y con uPAR (receptor activador del plasminógeno urocinasa). La coexpresión de uPARAP/Endo 180 y de la MMP-13 se ha observado en tejidos cuando hay formación de hueso y en osteoblastos y se cree que uPARAP/Endo 180 funciona para regular la presencia de esta proteasa en la superficie celular, sin embargo, no se ha podido demostrar una interacción directa entre ambos (6,7).

El activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) se encuentra en la superficie celular junto el receptor uPAR. El uPA convierte al plasminógeno en plasmína, que colabora con las MMPs en la degradación de fibras y otros componentes de la matriz. uPARAP/Endo 180 es parte de un complejo trimolecular con pro-uPA y uPAR y se ha encontrado coexpresión entre uPARAP/Endo 180 y uPAR durante la osteogénesis,. Endo 180 y uPAR se expresan en células de los estromas, en macrófagos y algunas células endoteliales. Dado que uPARAP/Endo 180 es un receptor endocítico, su función es regular la internalización de uPAR y juega un papel en la modulación de la actividad de pro-uPA/uPA. Con lo anterior, se nota que como MR, uPARAP/Endo 180 es un receptor multifuncional con un sistema de ligandos o correceptores. Su patrón de distribución junto con su lectina tipo C funcional, su capacidad de unirse a colágena y su interacción con uPAR sugieren que uPARAP/Endo 180 tiene un rol muy importante en la degradación y remodelación de la matriz extracelular (7,8) (Figura 3).



Fig 3. Esquema donde se muestra uPARAP/Endo 180 y sus dominios estructurales. El dominio rico en sisteina Cys-MR (rojo) interactúa con el CTLD activo (amarillo), el dominio de FNII Azul y los dominios CLTDs inactivos en verde, así como algunos de sus ligandos.(De: Boskoviv J. The Journal of Biochemistri 128, 2006).

Este receptor de colágena es endocitado y posteriormente, uPARAP/Endo 180 es enviado a donde están los endosomas y más tarde es reciclado hacia la superficie celular, entonces, la colágena es llevada por medio de uPARAP/Endo 180 hacia el interior de la célula, posteriormente es llevada hacia los lisosomas para su degradación, este último proceso de degradación es realizado por proteasas (13) (Figura 4).

En células deficientes en uPARAP/Endo 180, se demostró la falta de adhesión a colágena de matriz, y la falta de internalización de colágena en los fibroblastos deficientes de este gen.

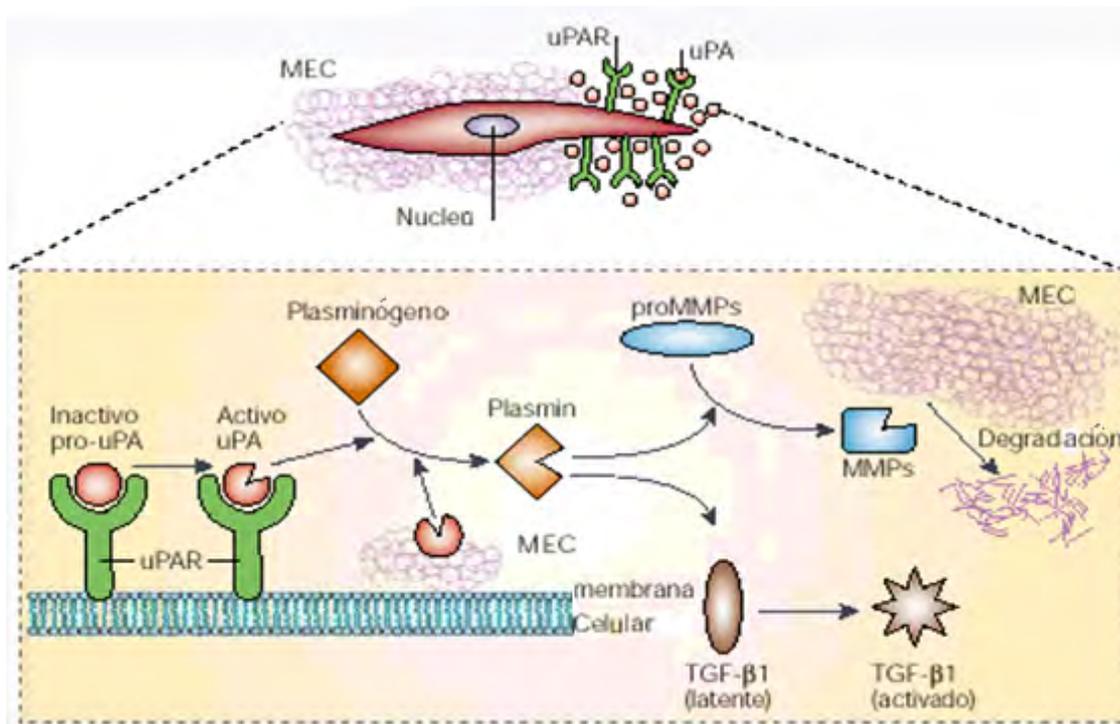


Fig 4. Esquema representativo de a la función de uPARAP/Endo 180. Activa el uPA que a su vez convierte el plasminógeno en un plasmin activo, el cuál activa las MMPs que degradan la MEC o activa los factores de crecimiento TGF-β.

Degradación intracelular de colágenas

Recientemente se ha propuesto, basado en estudios celulares *in vitro* e inmunohistoquímica que la degradación intracelular de colágena mediada por uPARAP/Endo180 es una vía importante en el recambio de colágena en procesos malignos.

uPARAP/Endo180 es un receptor constitutivamente endocítico que desempeña un papel fisiológico mediando la remodelación de colágena a través de su entrega a compartimentos lisosomales degradativos (9-16).

Fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar es el resultado final de numerosos y heterogéneos trastornos conocidos como enfermedades intersticiales pulmonares (EIP) y se caracteriza por la remodelación aberrante de la matriz extracelular con cambios dramáticos e irreversibles en la arquitectura pulmonar y una progresiva insuficiencia respiratoria que puede ser fatal. Algunas EIP tienen una etiología conocida por ejemplo, la exposición a partículas orgánicas o inorgánicas, la inducción por medicamentos o la asociación a enfermedades colágeno-vasculares. Sin embargo, alrededor de 40-50% de las EIP no tienen una etiología conocida y por lo tanto están clasificadas como neumonías intersticiales idiopáticas (NII). La NII más común y en gran medida la EIP más agresiva es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la cuál representa un trastorno pulmonar crónico, progresivo y generalmente letal. Es importante señalar que la mayoría de los pacientes con enfermedades intersticiales pulmonares presentan un comportamiento clínico heterogéneo, es decir, pueden curarse, mejorar o desarrollar fibrosis, pero los que presentan FPI, siempre presentan una progresiva destrucción del parénquima pulmonar (27, 28).

En la mayoría de las EIP, la inflamación es un acontecimiento crucial que precede el desarrollo de la fibrosis pulmonar, sin embargo, recientemente se ha postulado que en el caso de la FPI la inflamación no representa un papel patogénico. (27-30) En este contexto, se ha propuesto que hay dos rutas para el desarrollo de la fibrosis pulmonar: La vía inflamatoria, representada por la mayoría de las EIP como la neumonitis por hipersensibilidad, donde hay una temprana, clara y distinguible fase de alveolitis y posteriormente una fase fibrótica. La patogénesis de este tipo de fibrosis pulmonar está

comúnmente asociada a la respuesta inmune o inflamatoria que se desencadena después del daño pulmonar y varía dependiendo del agente causal e involucra células inflamatorias y varias redes de citocinas (27, 28).

Por otro lado está la vía epitelial representada por la FPI, donde la aberrante remodelación de matriz extracelular está mediada por interacciones entre epitelio alveolar y focos de fibroblastos (Figura 5) (25).

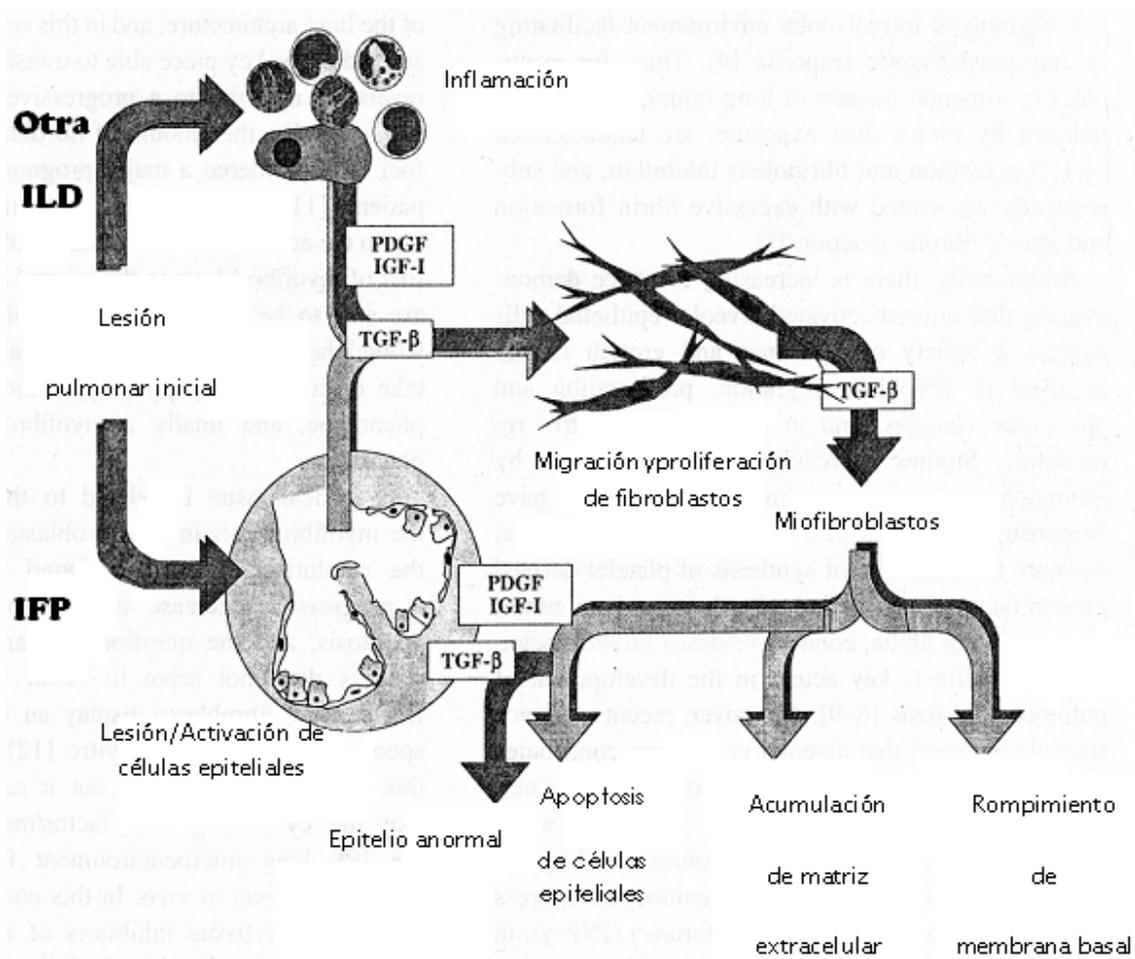


Fig 5. Esquema hipotético de las dos rutas del desarrollo de la fibrosis pulmonar. Una lesión inicial provocada por un factor conocido o desconocido, desencadena una respuesta inflamatoria o una activación de células epiteliales alveolares. La inflamación y las células epiteliales liberan citocinas y factores de crecimiento que inducen la proliferación de fibroblastos así como cambios en su fenotipo a miofibroblastos. En el microambiente del pulmón lesionado, los miofibroblastos pueden inducir apoptosis de células epiteliales, el rompimiento de la membrana basal y una remodelación descontrolada de la matriz extracelular. (De: Pardo A. *Frontiers in Bioscience*. 7, 1689-1707 2002)

Un modelo experimental ampliamente utilizado en el estudio de la fibrosis pulmonar es el que resulta de la instilación de bleomicina en roedores. Este proceso representa un modelo de fibrosis que sigue la vía inflamatoria. En este contexto a continuación se hará una breve reseña sobre inflamación.

Inflamación

Los estímulos exógenos o endógenos pueden producir lesiones, estos dan lugar a una reacción compleja en el tejido conjuntivo vascularizado, que se denomina inflamación (17).

El proceso inflamatorio se caracteriza por la capacidad de poner en marcha la reacción de los vasos sanguíneos que da lugar a la acumulación de líquidos y leucocitos en los tejidos extravasculares (17).

La respuesta inflamatoria está muy relacionada con el proceso de reparación. La inflamación es útil para destruir, atenuar o mantener localizado al agente patógeno y al mismo tiempo inicia una cadena de acontecimientos que en gran parte de las ocasiones resultan en la cura y reconstrucción del tejido lesionado. El proceso de reparación se desarrolla durante las fases iniciales de la inflamación, aunque no finaliza hasta que se ha neutralizado el estímulo lesivo. Durante la reparación, el tejido lesionado es sustituido por la regeneración de las células parenquimatosas nativas, por la proliferación de tejido fibroblástico (cicatrización) y con mayor frecuencia, por la combinación de ambos procesos (17,18).

La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias de la misma. Si no existiera el proceso de inflamación, las infecciones se propagarían de forma incontrolada, las heridas no se curarían nunca y los órganos lesionados presentarían lesiones supurativas de forma permanente. A pesar de esto, los procesos de inflamación y reparación pueden ser perjudiciales. Por ejemplo, las reacciones inflamatorias constituyen el mecanismo patogénico básico de las reacciones de hipersensibilidad potencialmente mortales secundarias al efecto de picaduras de insectos, fármacos o sustancias tóxicas, así como lo son de algunas de las enfermedades crónicas más frecuentes de la actualidad como la artritis reumatoide, la arterosclerosis y diferentes tipos de fibrosis en diversos órganos. (17,19).

La respuesta inflamatoria tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado y comprende al plasma, las células circulantes, los vasos sanguíneos y los constituyentes celulares y extracelulares del tejido conjuntivo. Las células circulantes son los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas. Las células del tejido conjuntivo son los mastocitos que se sitúan alrededor de los vasos sanguíneos; los fibroblastos del propio tejido conjuntivo, y ocasionales macrófagos y linfocitos residentes (19) (Fig. 6).

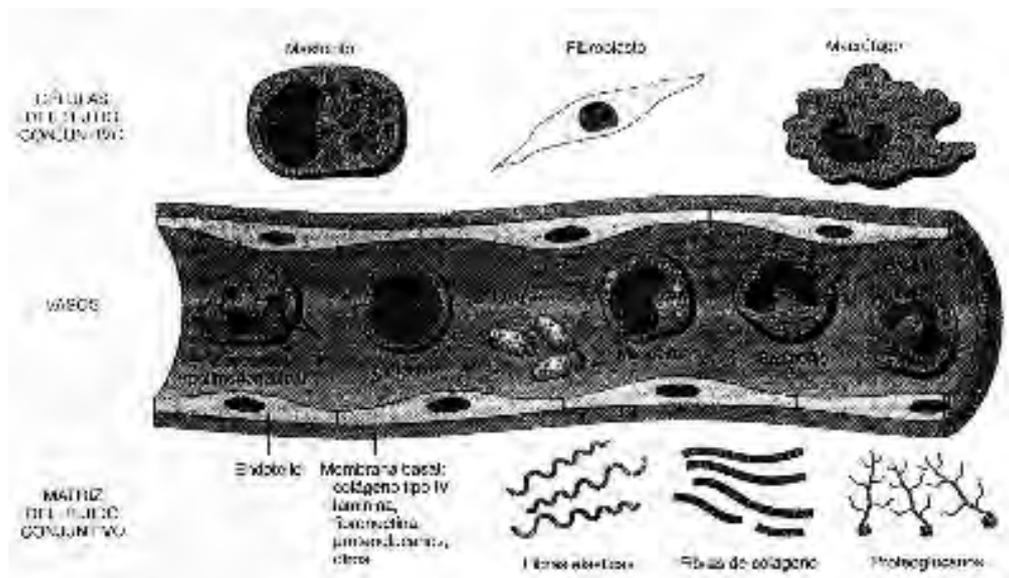


Fig. 6. Células vasculares y células de matriz del tejido conjuntivo implicadas en la respuesta inflamatoria (De: Ramsi S. et al, Patología Estructural y Funcional 6° Edición Edit McGraw Hill)

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica. La inflamación aguda tiene una evolución relativamente breve, con una duración que oscila entre minutos, horas y pocos días; sus características principales son la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas (edema), y la migración de leucocitos. La inflamación crónica tiene una duración mayor y se caracteriza por la presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular. La respuesta vascular y celular de las formas aguda y crónica de inflamación están mediadas por factores químicos procedentes del plasma o de las células y son activados por el propio estímulo inflamatorio. Estos mediadores actúan de forma aislada, secuencial o en combinación y en fases posteriores amplifican la respuesta inflamatoria

e influyen en su evolución. Las células y tejidos necróticos también pueden activar por sí mismos la elaboración de los mediadores de la inflamación. Esto es lo que ocurre en los procesos de inflamación aguda secundarios al infarto de miocardio. La inflamación termina cuando se elimina el estímulo lesivo y desaparecen o quedan inhibidos los mediadores de la misma (17, 18, 19).

Inflamación aguda.

La inflamación aguda es la respuesta inmediata que se produce frente al agente lesivo. Debido a que los dos principales factores defensivos son transportados normalmente por la sangre, los fenómenos vasculares desempeñan un papel decisivo en el proceso de inflamación aguda (17, 18).

La inflamación aguda presenta tres componentes principales.

- Las modificaciones en el calibre de los vasos, que dan lugar al aumento en el flujo de sangre.
- Las alteraciones en la estructura de la microvasculatura, que permiten la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos.
- La migración de los leucocitos desde el punto en el que abandonan la microcirculación hasta el foco de lesión en el que se acumulan.

Cambios vasculares

Los cambios en el flujo sanguíneo y en el calibre de los vasos se inician de forma muy rápida tras la lesión y evolucionan a un ritmo que depende de la intensidad de la misma. Las alteraciones empiezan cuando, después de un periodo de vasoconstricción arteriolar, se produce vasodilatación, que afecta inicialmente a las arteriolas y que posteriormente da lugar a la apertura de nuevos lechos capilares en la zona de lesión. Esta es la causa del aumento de flujo sanguíneo, provoca enrojecimiento e incremento de calor en la zona de lesión, posteriormente la circulación se vuelve más lenta debido al aumento de la permeabilidad de la microvasculatura, con salida de líquido rico en proteínas, desde la circulación hasta los tejidos extravasculares y la concentración de los eritrocitos en los vasos de pequeño calibre lo que se denomina estasis. A medida que evoluciona la estasis, se empieza a observar la orientación periférica de los leucocitos, principalmente

neutrófilos, a lo largo del endotelio vascular, un proceso que se denomina marginación leucocitaria. Más adelante, los leucocitos se adhieren al endotelio, de forma transitoria al principio y con mayor intensidad después, atravesando la pared vascular al cabo de un corto periodo de tiempo y dirigiéndose hacia el intersticio.

El aumento de la permeabilidad vascular que ocasiona la salida de un fluido rico en proteínas (exudado) hacia el intersticio es la característica principal de la inflamación aguda. La pérdida de proteínas del plasma reduce la presión osmótica intravascular e incrementa la presión osmótica del líquido intersticial, este mecanismo conduce a una importante salida y acumulación de tejido intersticial y el incremento del líquido extravascular lo que constituye el edema.

El aporte de leucocitos a la zona de lesión es una de las funciones más características de la inflamación, los leucocitos fagocitan los agentes patógenos, destruyen las bacterias y otros microorganismos, degradan el tejido necrótico y los antígenos extraños. Los leucocitos también pueden prolongar la inflamación e inducir lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y radicales tóxicos del oxígeno.

Cuando el flujo de la sangre es normal en las vénulas, los eritrocitos permanecen confinados en una columna axial central y desplazan a los leucocitos hasta la pared del vaso. A medida que disminuye la velocidad del flujo sanguíneo en las fases iniciales de la inflamación, ocurre la marginación y posteriormente, los leucocitos se adhieren y se fijan fuertemente, a esto se le conoce como rodamiento, con el tiempo el endotelio queda revestido por leucocitos. Posteriormente de estar adheridos, los leucocitos se dirigen hacia las uniones entre células endoteliales para atravesar la membrana basal y salir al espacio extravascular. Este mecanismo de salida lo utilizan los neutrófilos, los monocitos, los linfocitos, los eosinófilos y los basófilos (17, 19) (Figura 7).

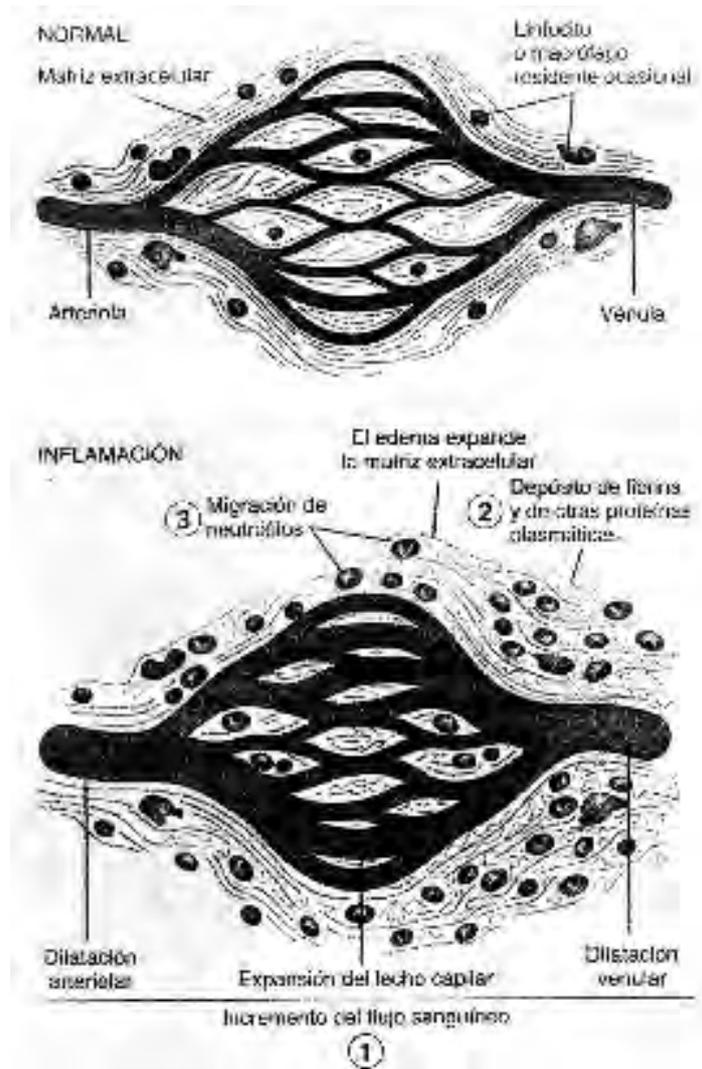


Fig. 7. Principales manifestaciones locales de la inflamación aguda comparadas con un tejido sin lesión. 1) Dilatación vascular (con eritema y calor), 2) extravasación de plasma y proteínas (edema) y 3) migración de leucocitos con acumulación de los mismos en la zona de lesión. (De: Ramsi S. et al, *Patología Estructural y Funcional 6º Edición Edit McGraw Hill*)

Se sabe que la adhesión y la trans migración de leucocitos están determinadas por la fijación de moléculas complementarias de adhesión a la superficie de los leucocitos y las células endoteliales, los mediadores químicos influyen en estos procesos regulando la expresión de superficie y la intensidad de fijación de estas moléculas de adhesión. Los receptores de adhesión pertenecen a cuatro familias de moléculas: las selectinas, las inmunoglobulinas, las integrinas y las glucoproteínas de tipo mucina.

Después de la extravasación, los leucocitos migran a los tejidos hasta alcanzar la zona de lesión, mediante la quimiotaxis, que se define como la locomoción ordenada según un gradiente químico, cada tipo de leucocito responde a los estímulos quimiotácticos con diferentes grados de velocidad (21).

Hay sustancias endógenas y exógenas que pueden actuar como factores quimiotácticos. Los agentes exógenos más comunes son los productos bacterianos, algunos poseen un aminoácido terminal N-formil-metionina. Otros tienen una naturaleza lipídica.

La fijación de los agentes quimiotácticos a receptores específicos situados en la membrana celular del leucocito da lugar a la activación de la fosfolipasa C, lo que a su vez produce la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,4-bisfosfato (PIP_2) e inositol-1.4.5-trifosfato (IP_3) y al diacilglicerol (DAG), así como la liberación de calcio; esta última se produce inicialmente a partir de las reservas intracelulares de calcio y más adelante por la afluencia de calcio extracelular. Es precisamente el incremento de calcio citosólico el factor que desencadena el ensamblaje de los elementos contráctiles responsables del movimiento celular.

Los leucocitos que migran en los tejidos encuentran patrones complejos de múltiples señales de quimioatracción, algunas endógenas como las quimiocinas y otras procedentes del agente causante de la lesión. Los leucocitos migran paso a paso en respuesta a un agonista, después de otro, quedando determinada su posición por el patrón de receptores para las sustancias de atracción que expresan y por la secuencia de gradiente de quimiocinas que se encuentran, las quimioactinas procedentes del foco de lesión anulan los gradientes derivados del huésped, facilitando de esta manera la guía del movimiento hasta el estímulo original.

La fagocitosis y la liberación de enzimas por los neutrófilos y macrófagos son dos de los principales efectos beneficiosos de la acumulación de leucocitos en el foco de inflamación.

Las alteraciones que sufre el metabolismo y las membranas de los leucocitos durante la quimiotaxis, la activación y la fagocitosis, dan lugar a la liberación de productos hacia el interior del fagolisoma y hacia el espacio extracelular. Las más importantes de estas sustancias son: las enzimas lisosomales, los metabolitos activos del oxígeno y los productos del metabolismo del ácido arquidiónico. Estos productos son potentes mediadores de la lesión endotelial y tisular, y amplifican los efectos del estímulo inflamatorio inicial, por lo tanto cuando evoluciona de forma persistente e incontrolada,

el propio infiltrado leucocitario se convierte en el agente lesivo, de manera que la lesión tisular producida por los leucocitos constituye un mecanismo patogénico básico en muchas enfermedades agudas y crónicas (18).

Evolución de la inflamación aguda.

Existen variables que pueden modificar el proceso de inflamación, en el que se incluyen la naturaleza e intensidad de la lesión, la zona y el tejido afectados y el tipo de respuesta de cada organismo. La inflamación puede presentar alguna de las siguientes formas de evolución.

- Resolución completa.- En la situación ideal y una vez que se han permitido neutralizar el agente o estímulo lesivo, todas las reacciones inflamatorias deberían finalizar con la normalidad del tejido en el que se produjo la lesión. Es la más habitual en los casos en que la lesión es limitada y de corta duración, la destrucción tisular es escasa y las células parenquimatosas presentan regeneración.
- Formación de absceso. Se observa fundamentalmente en las infecciones por microorganismos piógenos.
- Curación mediante sustitución por tejido conjuntivo.- Se produce en los casos, en los que ha existido una destrucción tisular sustancial, en los que la lesión inflamatoria afecta a tejidos que no regeneran, o cuando se produce una abundante exudación de fibrina que no puede ser reabsorbido de forma adecuada y prolifera tejido conjuntivo, convirtiéndolo en una masa de tejido fibroso.
- Progresión de respuesta tisular hacia inflamación crónica. Esta forma de evolución puede seguir a la inflamación aguda o puede ser crónica desde el principio. La transición entre la forma aguda y la crónica se produce cuando la respuesta de inflamación aguda no puede resolverse debido a la persistencia del agente lesivo o alguna forma de interferencia en el proceso normal de curación (17,18).

Inflamación crónica

Es una inflamación de duración prolongada, en la que se pueden observar simultáneamente signos de inflamación activa, de destrucción tisular e intentos de curación. Puede evolucionar desde un cuadro de inflamación aguda o se inicia de forma

incidiosa como una respuesta de baja intensidad o asintomática. La inflamación crónica se presenta cuando hay:

- Infecciones persistentes por algunos microorganismos.- Estos microorganismos presentan una patogenicidad baja e inducen una reacción inmunitaria que se denomina hipersensibilidad retardada.
- Exposición prolongada a agentes potencialmente tóxicos, endógenos y exógenos.- Materiales inertes no degradables que se pueden inhalar como el caso del sílice o en la arterosclerosis, que hay un proceso inflamatorio crónico de la pared arterial inducido por componentes lipídicos plasmáticos endógenos de carácter tóxico.
- Autoinmunidad.- Se producen reacciones inmunitarias contra los propios tejidos del organismo que las padece, se denominan enfermedades autoinmunitarias.

La inflamación crónica se caracteriza por:

- La infiltración por células mononucleares, como macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, esto refleja una reacción persistente a la lesión.
- Destrucción tisular, inducida por las células inflamatorias.
- Intentos de reparación mediante sustitución por tejido conjuntivo, con proliferación de vasos de pequeño calibre y fibrosis (17).

Tipos de células y mecanismos en la inflamación crónica.

El macrófago es la célula característica de la inflamación crónica, es uno de los componentes del sistema mononuclear fagocítico, está constituido por células procedentes de la médula ósea como los monocitos de la sangre y los macrófagos de los tejidos. Los macrófagos están distribuidos de forma difusa en el tejido conjuntivo ó se agrupan en algunos órganos como el hígado (células de Kupffer), el bazo y los ganglios linfáticos (histiocitos sinusales) y los pulmones (macrófagos alveolares). Todos los macrófagos se originan de un precursor común situado en la médula ósea, que también origina los monocitos de la sangre; desde la sangre, los monocitos migran hacia diferentes tejidos y se transforman en macrófagos. La hemivida de los monocitos de la sangre es de aproximadamente un día, mientras que la de los macrófagos tisulares es de varios meses. La transformación desde las células precursoras de la médula ósea hasta los macrófagos tisulares está regulada por diversos factores de crecimiento y diferenciación, citocinas, moléculas de adhesión e interacciones celulares (17, 24).

Los monocitos empiezan a migrar en fases iniciales de la inflamación aguda y después de 48 horas constituyen el tipo predominante de célula. La extravasación de los monocitos está controlada por los mismos factores que participan en la migración de los neutrófilos, es decir, las moléculas de adhesión y los mediadores químicos con propiedades quimiotácticas y de activación. Cuando el monocito alcanza el tejido extravascular, se transforma en una célula fagocitaria de mayor tamaño, un macrófago. Además de fagocitar, los macrófagos pueden ser activados, un proceso que hace que aumenten de tamaño, que se incrementen sus niveles enzimáticos lisosomales, que su metabolismo sea más activo y que se incremente su capacidad para fagocitar y destruir los microorganismos que ingiere. Entre las señales de activación se incluyen citocinas, las endotoxinas bacterianas, otros mediadores químicos y proteínas de matriz extracelular como la fibronectina. Tras su activación, los macrófagos secretan una amplia variedad de productos biológicamente activos que, cuando no están contrarrestados, son mediadores importantes en la destrucción tisular, en la proliferación vascular y en la fibrosis característica de la inflamación crónica. En la inflamación de corta duración, los macrófagos desaparecen cuando es posible eliminar el agente lesivo, en la inflamación crónica, persiste la acumulación de macrófagos mediada por mecanismos diferentes con el tipo de reacción.

El macrófago es muy importante en la inflamación crónica debido al número de sustancias biológicamente activas que produce. Algunas de ellas son tóxicas para las células o para la matriz extracelular como los metabolitos del oxígeno y las proteasas, otros productos biológicos como las citocinas o los factores quimiotácticos, atraen otros tipos de células y los factores de crecimiento dan lugar a la proliferación de fibroblastos y un depósito de colágena. Todo esto hace que los macrófagos sean eficaces en la protección del organismo, y también puede ser factor de lesiones tisulares en los casos en los que los macrófagos son activados inadecuadamente, esta destrucción tisular es una de las características más importantes en la inflamación crónica. El tejido necrótico por sí mismo puede perpetuar la cascada inflamatoria a través de diferentes mecanismos, como la activación de los sistemas de las cininas, de la coagulación, del complemento y de la fibrinólisis, además de la liberación de mediadores a partir de los leucocitos muertos o en fase de destrucción (17, 24).

El modelo de fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina

Mucho de lo que actualmente conocemos sobre la patogénesis de la fibrosis pulmonar (FP) proviene de estudios realizados en animales. Los métodos convencionales para inducir FP experimental incluyen la instilación directa de un agente fibrogénico a través de la tráquea o la exposición a radiación torácica de un animal susceptible (35).

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, debido a que presenta varias ventajas sobre otras especies como: un genoma bien caracterizado, ciclo reproductivo corto, camadas grandes, tamaño pequeño, y bajo costo de manutención en bioterios.

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. Dependiendo de la dosis de bleomicina administrada y de la cepa de ratón utilizada, el tiempo de evolución del daño pulmonar varía. Se ha descrito que en las cepas susceptibles alrededor de tres días postinstilación hay un aumento en la celularidad de los septos alveolares debido a la infiltración de células inflamatorias, principalmente macrófagos y neutrófilos. Posteriormente alrededor del día seis hasta un mes después de la instilación, 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. Finalmente 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 (31).

OBJETIVO

En virtud de que en nuestro grupo de trabajo estamos interesados en estudiar los mecanismos responsables de la fibrosis pulmonar, en este estudio decidimos analizar el papel que desempeña uPARAP/Endo180 en este proceso patológico. El interés en esta molécula deriva de su posible participación en el catabolismo de la colágena, una de las principales moléculas que se acumulan en la fibrosis. Para alcanzar este objetivo se analizó la respuesta inflamatoria inducida por bleomicina en ratones deficientes en uPARAP/Endo 180 y se comparó con ratones silvestres.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ratones utilizados para la realización de este trabajo fueron donados por el Dr. Thoms Bugge y Marisa Kuhnen del Instituto Nacional de Salud (NIH) y *del National Institute of Dental and Carcinofacial Institute (NIDCR)*, Bethesda, Meryland. Son ratones de tipo C57Bl/6 de la especie *Mus musculus*, a los cuales se les suprimió el gen uPARAP/Endo 180, el cuál fue reemplazado por un cassette de expresión HPRT (8).

Genotipificación de ratones.

Los ratones se mantuvieron y reprodujeron en el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Para su genotipificación se usaron fragmentos de colas de ratón de donde se extrajo el ADN.

Extracción de ADN de colas de ratón

Día 1

Las colas de aproximadamente 1 – 1.5cm de cada ratón, se rasuraron perfectamente y se enjuagaron con agua DEPC y con agua dde (hasta quitar los pelos sueltos), se cortaron en fragmentos pequeños y se colocaron en tubos ependorff.

1. Se adicionaron 500 μ l de buffer de lisis (ver apéndice) y 20 μ l de proteinasa K (10mg/ml).
2. Se incubaron una noche a 55°C

Día 2

1. Se agitaron los tubos y se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo.
2. Se adicionó a cada tubo 1 ml de etanol absoluto y se agitó hasta obtener la hebra de ADN.
3. Se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto y se decantó el sobrenadante.

4. Se adicionó a cada tubo 700 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto, posteriormente se recuperó el pellet y se dejó secar.
5. Se adicionaron 150 µl de agua dde y se dejó incubar en agitación constante a 55°C, posteriormente se mantuvieron a -20°C hasta su uso.
6. La integridad del ADN fue verificada mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v).
7. La concentración del ADN fue determinada mediante espectrofotometría, se midió la absorbancia con una longitud de onda de 260 nm y se utilizó la siguiente fórmula.

[ADN] µg/ml = (A₂₆₀) (50) (dilución), donde:

- [ADN] indica la concentración de ADN
- A₂₆₀ indica la absorbancia (o densidad óptica) leída a 260 nm
- 50 es el coeficiente de extinción del ADN
- Dilución, se refiere a la cantidad de agua en la que se diluyó la muestra de ADN para ser leída.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó la identificación del genotipo de los ratones *Wild-Type* (uPARAP/Endo 180 +/+) y KO (uPARAP/Endo 180 -/-) amplificando las secuencias correspondientes mediante una PCR. Las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores son:

Ratón silvestre

uPARAP/Endo180 E 3-5' SENSE	(5'-3') TCTACACCATCCAGGGAAACTCAC
uPARAP E3-5' ANTISENSE	(5'-3') TTAAACTGGTAACAGCTGTCAGTC

Ratón transgénico

uPARAP targ SENSE	(5'-3') TCCTACAAATACACGCTGGCGATA
HPRT ANTISENSE	(5'-3') GCAGTTCCTTTTAAATGCAAATCA

Los componentes de la mezcla de reacción son los siguientes.

Componente	V1x (μl)	[] Final
MgCl ₂	2	10 mM
Buffer 10x	2.5	1x
dNTPs	1.25	1 mM
Primers sense	2.5	-
Primers antisense	2.5	10 nM
Agua DEPC	12	10nM
Amplitaq Gold	.25	1.25 u/μl
Muestra	2	10 ng

Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción de PCR.

Las condiciones de corrida para la PCR fueron:

(40 ciclos)

WT 94°/2' 95°/10' $\left(94^{\circ}/20'' \quad 60^{\circ}/20'' \quad 70^{\circ}/30'' \right)$ 72°/5' 4°/∞

(40 ciclos)

KO 95°/10' $\left(94^{\circ}/20'' \quad 60^{\circ}/20'' \quad 72^{\circ}/25'' \right)$ 72°/5' 4°/∞

El análisis de los productos de PCR se realizó por medio de electroforesis en geles de agarosa (2.5%), las bandas esperadas fueron de 180 para KO y de 363 para WT.

Modelo de fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina.

Para la inducción de fibrosis, los ratones fueron tratados con una dosis de 0.03 unidades de bleomicina, por cada diez gramos de peso del ratón, la dosis fue preparada momentos antes de comenzar con la cirugía. Los ratones fueron previamente anestesiados con Pentobarbital sódico e inmovilizados sobre una mesa de disección en posición ventral. Con el cuello expuesto, se realizó una pequeña incisión dérmica, lo cual expone el timo. Con unas pinzas esterilizadas se separa el timo y se expone la tráquea permitiendo la inserción de la aguja para aplicar la dosis de bleomicina. Ya que se realizó la incisión, esta es suturada y para evitar infecciones y facilitar la cicatrización, se aplicó Topazone® en aerosol. Los ratones se colocaron en una plancha de calor a 37°C hasta que despertaron de la anestesia, esto para mantener su temperatura y evitar complicaciones.

Sacrificio de ratones y Lavados Bronquio alveolares LBA

Los ratones controles y los que fueron instilados con bleomicina se sacrificaron 7 días después con una dosis de Pentobarbital sódico inyectada intraperitonealmente.

Los pulmones de los ratones fueron lavados en dos ocasiones con alícuotas de 800 µl de solución salina a través de un catéter de punta fina que se introdujo en la tráquea de los ratones.

La solución salina fue recuperada por aspiración con una jeringa y se colocaron en tubos ependorff., posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante diez minutos. Se obtuvo el pellet y se congeló el sobrenadante.

El pellet obtenido se resuspendió en 100 µl de PBS para realizar el conteo diferencial de células.

En los lavados se obtienen las distintas células con las que se realizó el conteo diferencial.

Simultáneamente al proceso de obtención de los lavados se obtuvieron los pulmones. Los pulmones derechos fueron aislados para deshidratar y determinar la concentración de hidroxiprolina y los izquierdos fueron fijados por inmersión durante 24 horas en formol amortiguado (10% p/v) para su análisis histológico.

Conteo diferencial de células inflamatorias

Se tomaron 10 µl del pellet resuspendido en PBS y se le añadieron diez µl de azul de tripano, al resto se le añadieron 90 µl de CBX para fijar.

Se realizó el conteo diferencial montando la cámara de neuvawer en el microscopio óptico para obtener el número total de células de cada lavado.

Los diferentes tipos celulares que se consideraron para el conteo fueron macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos, cada tipo celular se determinó de acuerdo a sus características.

Determinación de la concentración de hidroxiprolina.

Se determinó la concentración de colágena en el pulmón derecho de cada ratón mediante la técnica de Woessner (32).

Cada pulmón se dejó en el horno hasta que estuviera totalmente deshidratado, posteriormente se les añadieron 4 ml de HCl (6N) y se incubaron durante 24 horas para que se lleve a cabo la hidrolización de las muestras. Las muestras fueron filtradas, evaporadas y se neutralizaron a pH 7 usando HCl y NaOH y se aforaron a 2 ml con agua destilada para su posterior refrigeración.

Se realizó la curva patrón de hidroxiprolina.

Se realizó la prueba de determinación colorimétrica de hidroxiprolina de las muestras y se comparó con la curva para patrón para calcular la concentración de colágena. (32).

Ecuación para calcular la concentración de colágena en tejidos deshidratados.

$(Do) (m) (\text{factor de dilución}) (7.2)/\text{mg hidrolizados} = \text{mg de colágena/ g de tejido seco.}$

Procesamiento histológico.

El pulmón izquierdo de cada ratón fue procesado en el laboratorio de Morfología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y se le realizó las técnicas de:

- Tinción H-E (Hematoxilina –Eosina)
- Tinción Tricrómica de Masson

Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo de cambios morfológicos a cada pulmón

Estadística

El análisis estadístico consistió en análisis de varianza (ANOVA) y una prueba múltiple de comparación de DUNNETT, realizadas con el programa inerSTAT-a v 1.7 b del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

RESULTADOS

Caracterización genética

Extracción de ADN de colas de ratón.

Mediante una electroforesis en geles de agarosa se comprobó la integridad del ADN extraído como se observa en la figura 8 que es un gel representativo del ADN de 5 ratones.

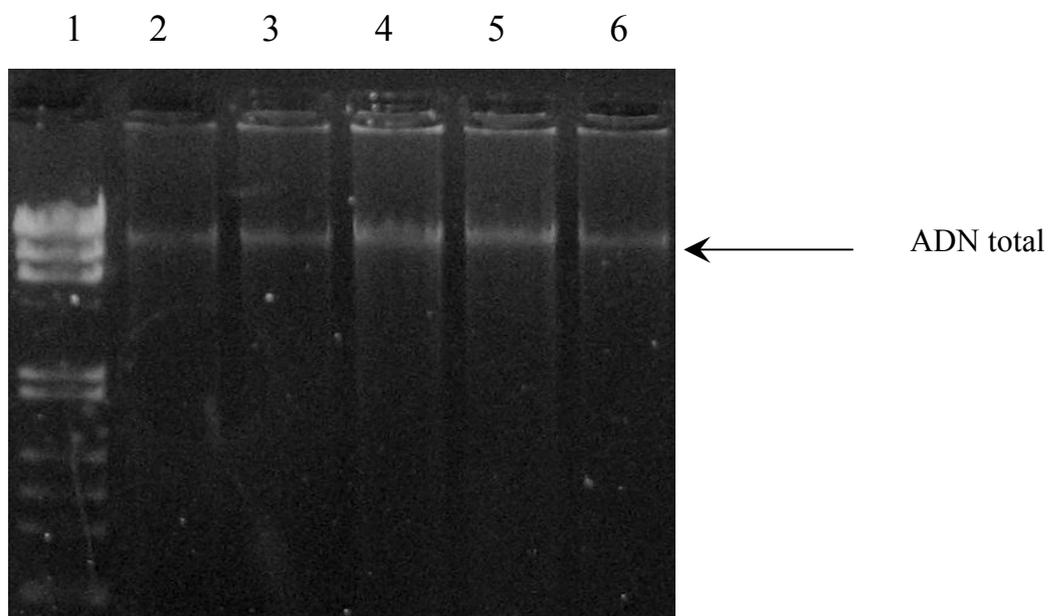


FIG 8.- Electroforesis en gel de azarosa 1%(p/v).Carril 1: Marcador de pesos moleculares λ DNA/Hind III Gibco BRL products (ADN). Carriles 2-6: ADN total en muestras.

Una vez corroborada la integridad del ADN extraído de los 18 ratones, estos se genotipificaron mediante PCR.

Genotipificación de ratones.

Se amplificaron las secuencias de ADN correspondientes al gen uPARAP/Endo 180 +/+ (WT) y al gen nulo uPARAP/Endo 180 -/- (KO).

Los ratones silvestres (WT) se identificaron por la presencia de una banda de 363 pb, los ratones nulos en uPARAP/Endo 180 -/-, por la amplificación de una banda de 180 pb y los ratones heterocigotos por la presencia de ambas bandas (Figura 9).

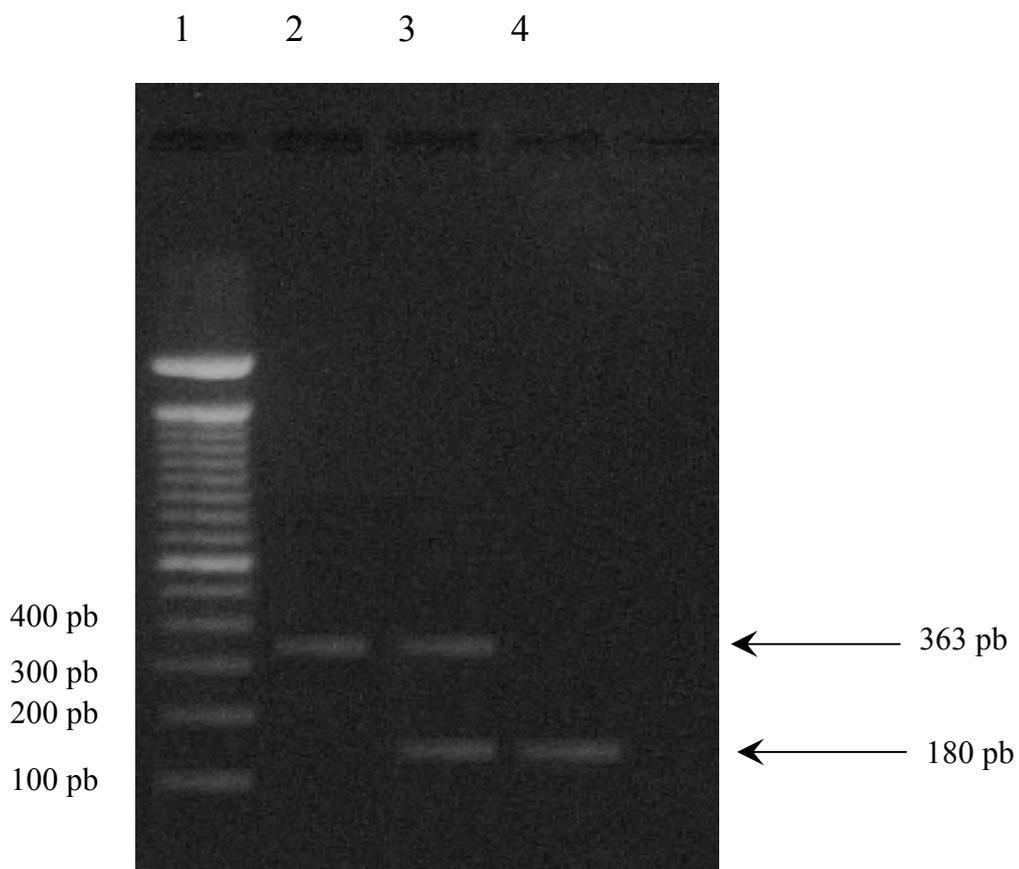


Fig. 9. *Electroforesis en gel de agarosa para amplificación de secuencias WT y KO*
Carril 1. *Marcador de pesos moleculares (ADN 100 pb) Gibco BRL Products.*
Carril 2. *Muestra correspondiente al gen WT*
Carril 3. *Muestra correspondiente al gen HT*
Carril 4. *Muestra correspondiente al ratón KO*

A partir de la amplificación por PCR, se definieron los siguientes genotipos para los ratones.

# Ratón	uPARAP/Endo 180 (WT)	uPARAP/Endo 180 (KO)	Genotipo
43	+	+	WT
44	+	-	HT
56	+	+	WT
57	+	+	WT
58	+	+	WT
74	+	+	WT
76	+	+	WT
82	+	-	HT
85	+	-	HT
87	+	-	HT
88	+	-	HT
108	+	-	HT
109	+	+	WT
110	+	-	HT
111	+	-	HT
112	+	-	HT
113	+	+	WT
114	+	+	WT

Tabla 3. Determinación genética. Se encontraron 9 organismos *Wt* y 9 organismos *Ht*.

En virtud de que disponíamos fundamentalmente de ratones heterocigotos (HT) y ratones silvestres (WT), ya que los ratones KO fueron muy escasos y no se pudieron utilizar en este experimento, se instiló bleomicina a 4 ratones HT y 4 ratones WT para analizar la respuesta inflamatoria pulmonar.

Lavado bronquio alveolar (LBA)

Conteo diferencial de células

Se realizó el lavado bronquio alveolar como se detalló en la sección de materiales y métodos, el conteo de número total de células reveló que los ratones controles WT y HT no presentan diferencias significativas (8133 ± 3681 células WT y 9000 ± 4280 células HT). Al comparar los ratones WT y HT que fueron sometidos al tratamiento a bleomicina a 7 días, no presentaron diferencias significativas en el número total de células (202666 ± 59313 células WT y 193800 ± 55696 células HT), no obstante, los ratones WT y HT que fueron instilados con bleomicina, presentan un aumento significativo en el número de células al compararlos con sus controles respectivos ($p < 0.01$) (Figura 10).

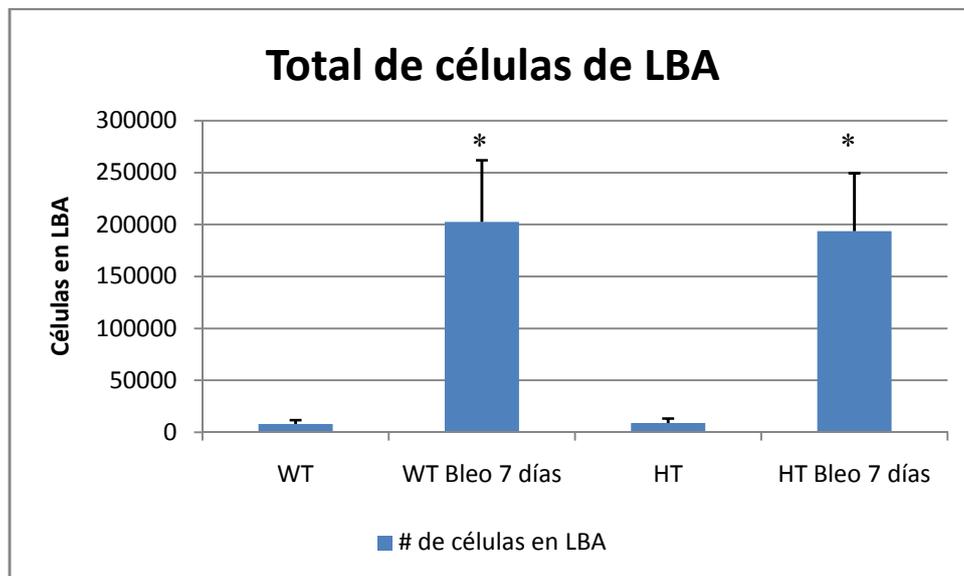


Fig10. Número de células totales de Lavado Bronquio alveolar en los grupos experimentales.
* $p < 0.01$

El conteo diferencial de células inflamatorias mostró que no hay diferencia significativa al comparar el número de células en ratones WT y HT controles (7469.3 ± 5744.8 macrófagos WT y 86668.5 ± 2859.1 macrófagos HT), (552 ± 358.6 linfocitos WT y 292.5 ± 69.2 linfocitos HT) (96 ± 83.3 neutrófilos WT y 39 ± 67.5 neutrófilos HT), (16 ± 27.7 eosinófilos WT y 0 ± 0 eosinófilos HT). Al comparar el número de células en ratones WT y HT con bleomicina a 7 días, no presentan diferencias significativas (132466.6 ± 49123.3 macrófagos WT y 124410.6 ± 39913 macrófagos HT), (56093.3 ± 26406.3 linfocitos WT y 55548.6 ± 15625.9 linfocitos HT), (10893.3 ± 11372.2 neutrófilos WT y 11194.6 ± 2197.2 neutrófilos HT), (3213.3 ± 3022.6 eosinófilos WT y 2646 ± 1424.9 eosinófilos HT). Hay un aumento significativo en el número total de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en ratones WT y HT sometidos a bleomicina, esto al compararlos con sus controles respectivos ($p < 0.01$). (Figura 11).

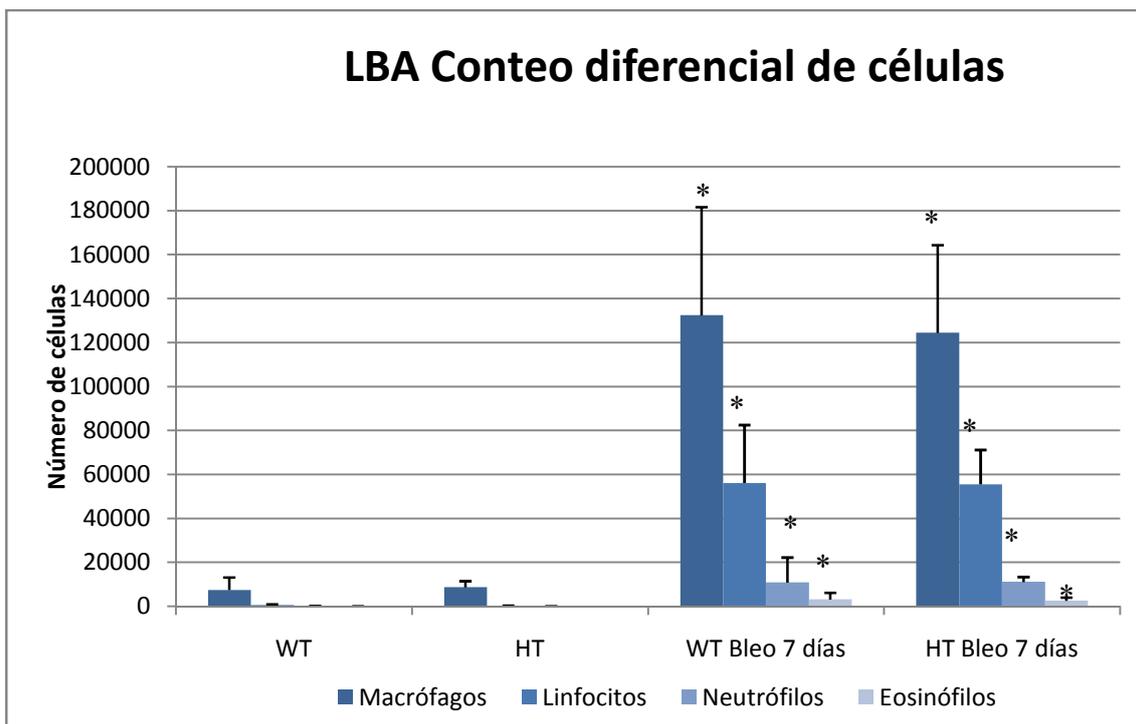


Fig 11. Conteo diferencial realizado a organismos de tipo WT y HT controles y WT y HT instilados con bleomicina a 7 días. * $p < 0.01$

Al comparar los porcentajes de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en los ratones WT y HT, muestra que no hay una diferencia significativa (66.6 % \pm 4.5 macrófagos WT y 63.6 % \pm 11 macrófagos HT) , (27.3 % \pm 2 linfocitos WT y 29.3 % \pm 8.9 linfocitos HT), (4.6% \pm 3 neutrófilos WT y 6 % \pm 2 neutrófilos HT), (1.3% \pm 1.1 eosinófilos WT y 1.3 % \pm 0.5 eosinófilos HT) (Figura 12).

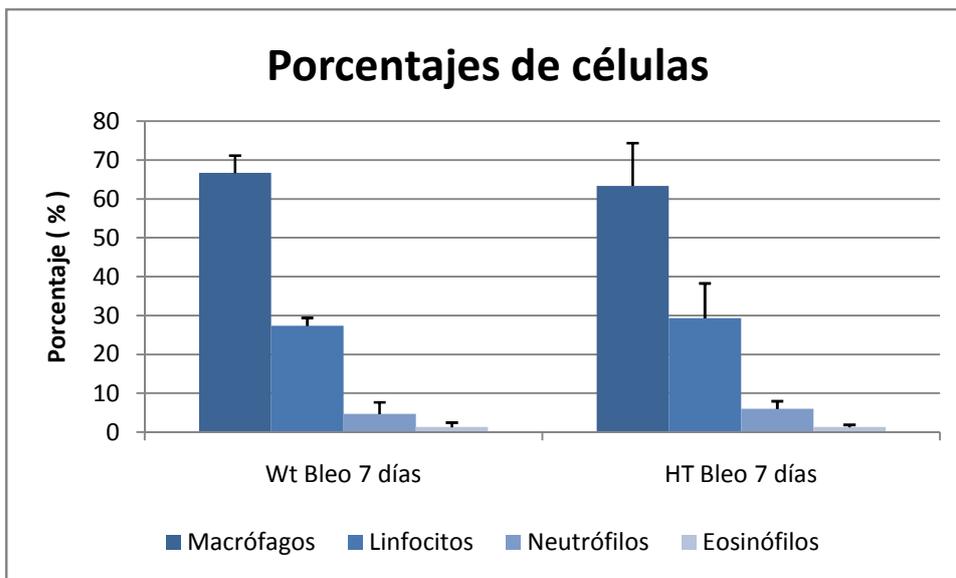


Fig 12. Porcentajes de los tipos celulares involucrados en la respuesta inflamatoria en ratones WT y HT a 7 días de la instilación.

Concentración de Hidroxiprolina

Se cuantificó la hidroxiprolina en el pulmón derecho de los ratones uPARAP/endo 180 +/+ (WT) y uPARAP/endo 180 +/- (HT) controles, así como los que se sometieron al tratamiento con bleomicina, para determinar la concentración de colágena. Se utilizó la técnica de Woessner (20) (Figura 13).

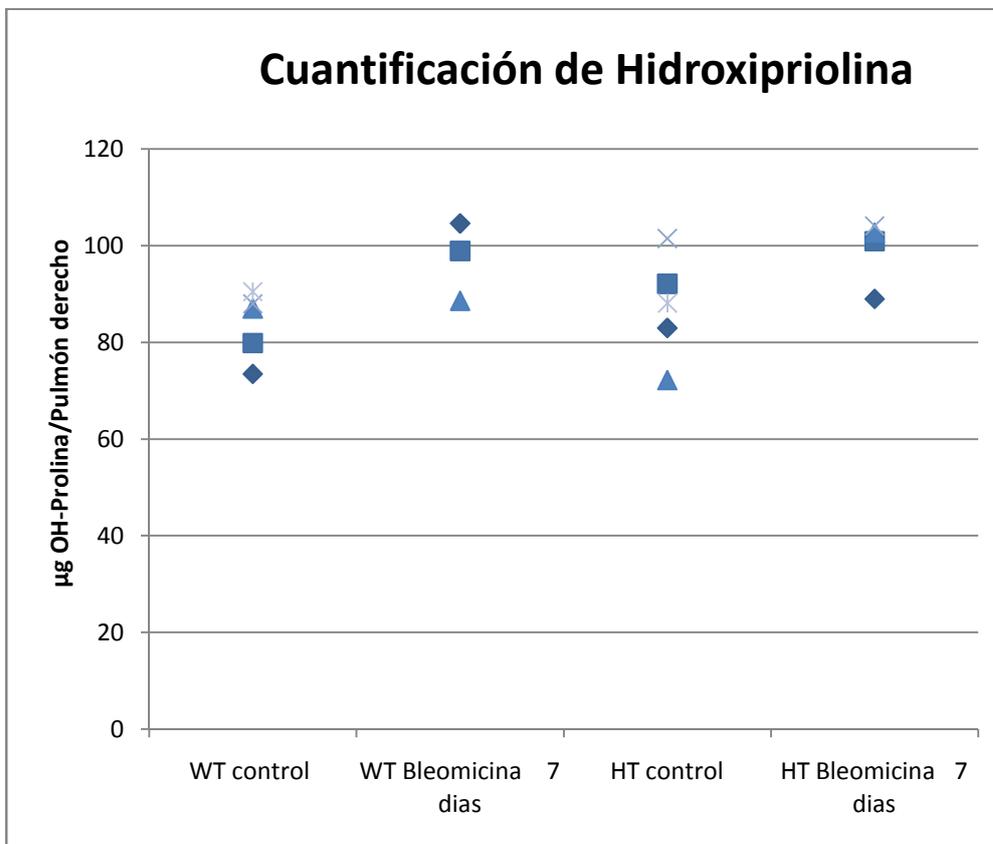


Fig 13. Cuantificación de hidroxiprolina de cada una de las muestras problema.

La concentración de hidroxiprolina de los pulmones de los ratones control WT y HT no presentan diferencias significativas ($83.7 \pm 6.9 \mu\text{g OH-Prolina/Pulmón derecho WT}$ y $87.3 \pm 10.8 \mu\text{g OH-Prolina/Pulmón derecho HT}$). A los 7 días postbleomicina, no se presentan diferencias significativas entre WT y HT ($97.3 \pm 8.1 \mu\text{g OH-Prolina/Pulmón derecho WT}$ y $99.17 \pm 6.9 \mu\text{g OH-Prolina/Pulmón derecho HT}$), así mismo, hay un aumento significativo en la concentración de hidroxiprolina en los pulmones WT y HT sometidos al tratamiento a bleomicina, esto al compararlos con sus controles respectivos ($p < 0.01$) (Figura 14).

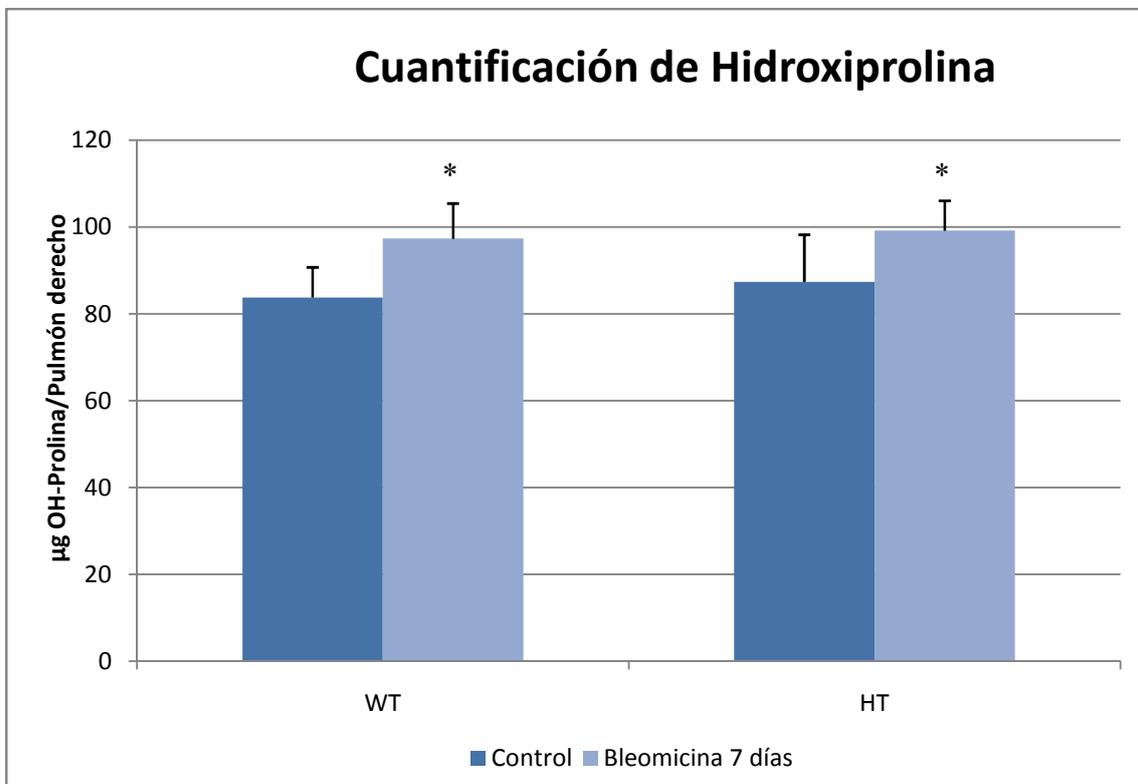


Fig 14. Concentración de hidroxiprolina en ratones WT y HT controles y el efecto que causó el tratamiento con bleomicina a 7 días en su concentración de Hidroxiprolina. * $p < 0.01$

Histología

Los cortes de pulmones fueron procesados con técnicas histológicas de rutina se tiñeron con hematoxilina y eosina y con la técnica de tricrómica de Masson y se observaron a diferentes aumentos en un microscopio óptico.

En los ratones control, la microestructura pulmonar no presentó diferencias notables entre los genotipos WT (Figura 15 a, b) y HT (Figura 15 c, d). Los dos presentaron similitud en cuanto al parénquima alveolar y tamaño en bronquios y bronquiolos.

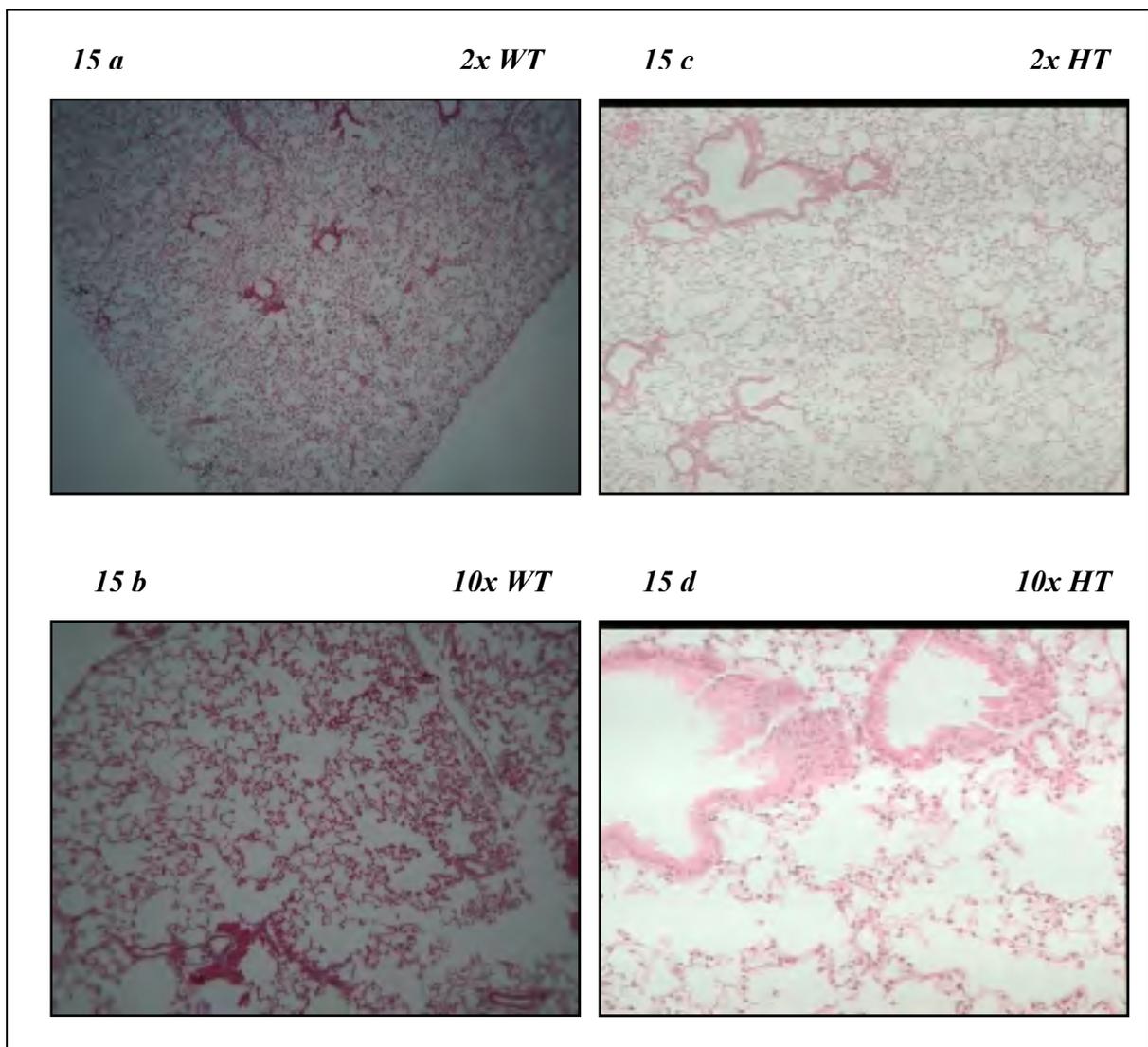


Fig 15. Fotografía de pulmón de ratón que ejemplifica a los ratones controles *uPARAP/Endo180+/+* y *uPARAP/Endo180+/-*. (a) 2X Tricrómica de Masson Ratón WT, (b) 10X Tricrómica de Masson Ratón WT, (c) 2X Tinción HE. Ratón HT, (d) 10X Tinción HE. Ratón HT

Los pulmones de los ratones que fueron instilados con bleomicina, no presentan diferencias significativas entre los genotipos WT (Figura 16 a, b) y HT (Figura 16 c, d). En lo que se refiere al parénquima pulmonar presenta algunas rupturas. Se observa inflamación en grado severo, en aproximadamente un tercio del pulmón (Figura 16 a, b, c, d). Se observan focos de inflamación y acumulación de células inflamatorias, en mayor cantidad macrófagos y linfocitos (Figura 17 a), los eosinófilos y neutrófilos en menor número (Figura 17 b). Hay destrucción de parénquima. En algunas partes se observa sustitución por tejido conjuntivo (fibras de colágena) (Figura 16 c, d).

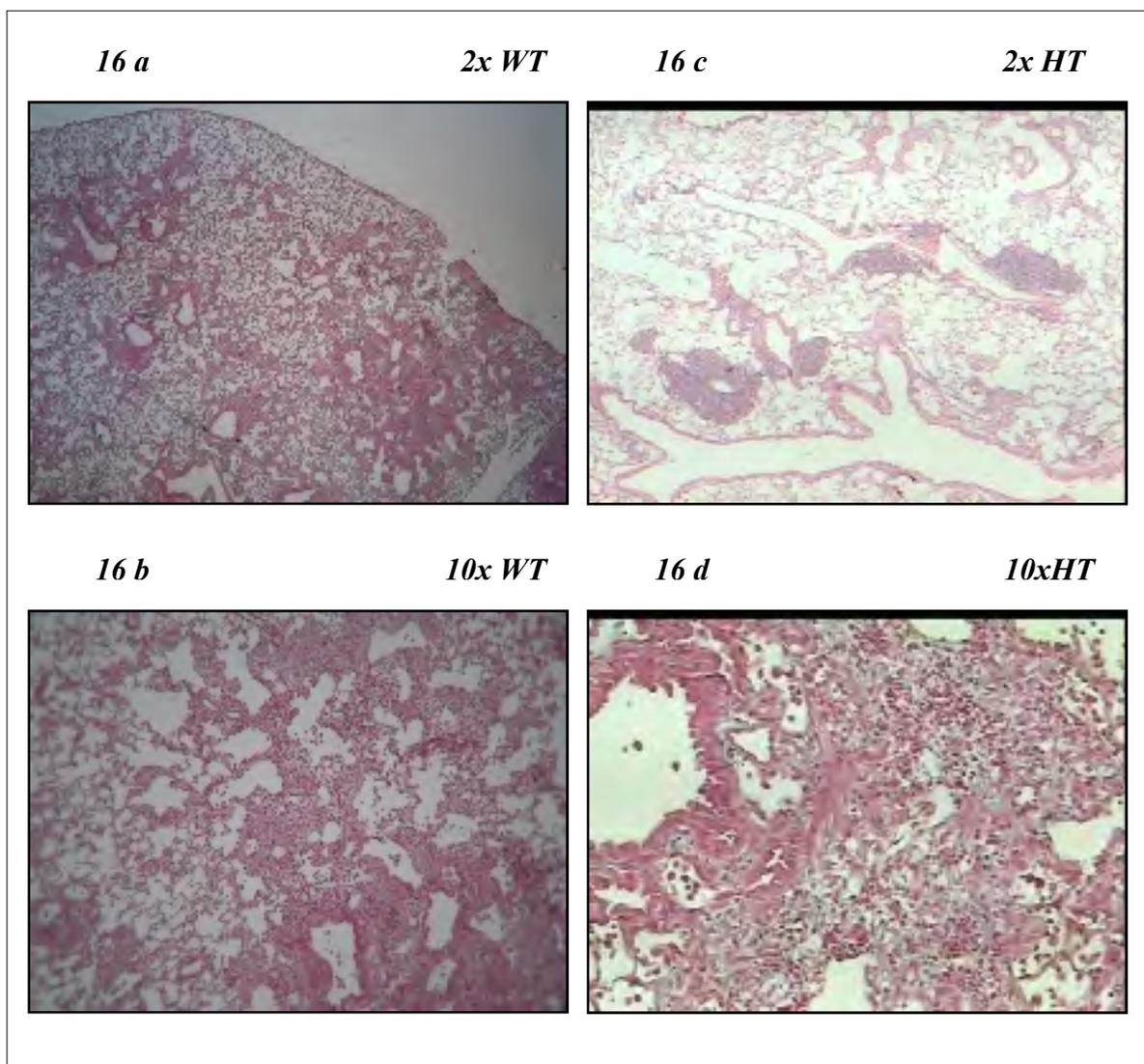


Fig16. Fotografía de pulmón de ratón que ejemplifica a los ratones tratados con bleomicina a 7 días *uPARAP/Endo180+/+* y *uPARAP/Endo180+/-*. (a) 2X Tricrómica de massonWT, (b) 10X tricrómica de Masson WT Ratón . (c) 2X Tinción H-E, Ratón HT, (d) 10 X 2X Tinción H-E, Ratón HT.

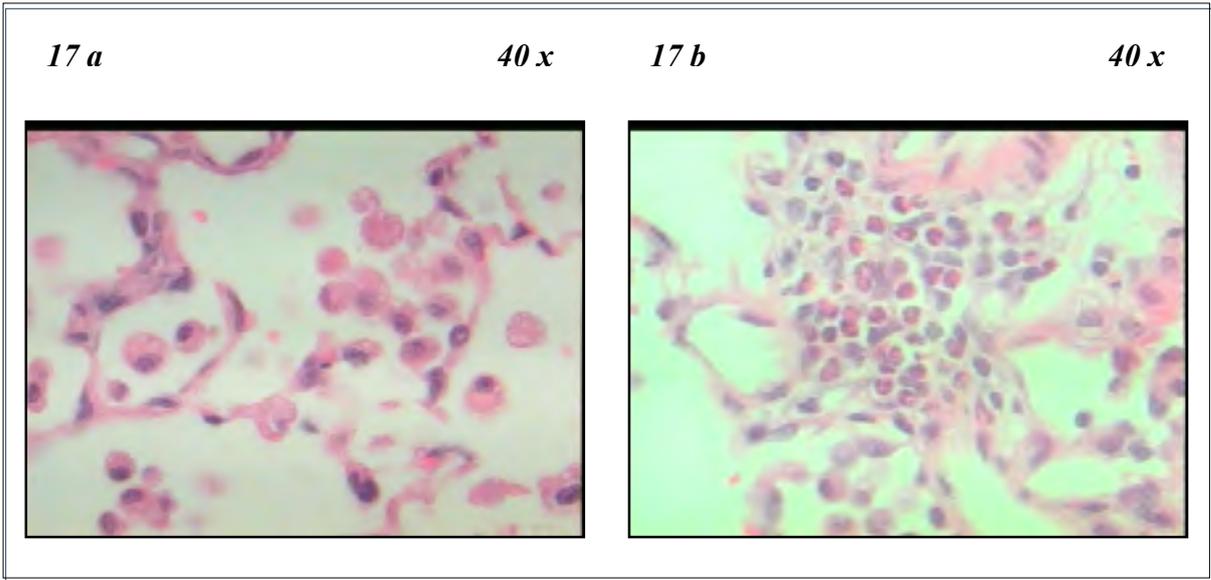


Fig 17. Foto representativa de las células inflamatorias. (a) Macrófagos 40X tinción H-E (b) Neutrófilos 40X tinción H-E.

DISCUSIÓN

La capacidad que tienen los mamíferos de remodelar la MEC es esencial en el desarrollo, en la homeostasis y en la remodelación de diversos tejidos a lo largo de la vida, también juega un papel en el desarrollo de algunas enfermedades proliferativas y degenerativas como el cáncer.

La remodelación fisiológica y patológica de la MEC depende de una compleja interacción de diversos factores tales como la motilidad celular, los receptores que participan para la adhesión de los componentes de la matriz a ciertas células y a la interacción con proteasas en la superficie celular (8, 13).

Las colágenas son abundantes en la MEC y así como otros componentes de la matriz, están en constante síntesis y degradación, debido a su estructura tan compleja, las colágenas son degradadas por proteasas extracelulares como las MMPs.

Las colágenas pueden ser degradadas también vía intracelular, estudios recientes demuestran que, en la vía endocítica para la descomposición de colágena, uPARAP/Endo 180 es un factor importante en su internalización para la colagenólisis (13). En ese estudio se resalta la importancia de comprender el funcionamiento de uPARAP/Endo 180 y la interacción entre los eventos intracelulares y extracelulares en la remodelación de colágena (13).

uPARAP/Endo180 es un receptor con multidominios estructurales y es parte de la familia de receptores de manosa, los cuatro miembros de la familia se caracterizan por tener funciones de internalización y anclaje de diversos ligandos. uPARAP/Endo 180 se une a colágena y por medio de endocitosis, son enviados hacia endosomas y posteriormente es reciclado hacia la superficie celular, la colágena que fue internalizada por uPARAP/Endo 180 es enviada hacia los lisosomas para su degradación (8,10,12,13).

En este estudio, se analizó la respuesta inflamatoria en ratones uPARAP/Endo180^{+/+} y uPARAP/Endo180^{+/-} que fueron sometidos a la instilación con bleomicina. .

El conteo diferencial de células realizado en el LBA en los ratones tratados con bleomicina mostró que a los 7 días, los ratones WT y HT desarrollaron una respuesta inflamatoria muy similar. Esta respuesta inflamatoria se caracteriza por un incremento en el número de células inflamatorias en las que predominan los macrófagos y linfocitos células principales de la inflamación en su fase crónica, lo que indica que su activación se ha mantenido por la persistencia del daño causado por la bleomicina, la activación de las células inflamatorias está mediada por citocinas, señalizadores químicos y algunas proteínas de matriz como la fibronectina, los macrófagos activados secretan una serie de productos biológicamente activos que a su vez funcionan como mediadores en la destrucción tisular, en la proliferación vascular y en el desarrollo de la fibrosis característico de la inflamación crónica. La alveolitis que se presenta en esta etapa es similar a la reportada en organismos de otras especies (32).

Es interesante señalar que varios estudios han mostrado que una reducida acumulación de neutrófilos después del tratamiento con bleomicina se relaciona con una fibrosis pulmonar disminuida. Así en ratones deficientes en gamma-glutamil transpeptidasa (31), en ratones deficientes en MMP7 (33) o en ratones que sobre expresan MMP9 (34) la instilación con bleomicina reveló menor número de neutrófilos en LBA y menor fibrosis pulmonar comparados con sus respectivos controles.

En este estudio, no se observaron diferencias en el número de neutrófilos y el desarrollo de fibrosis pulmonar analizado un mes después del tratamiento con bleomicina mostró que la fibrosis que desarrollaron los ratones WT fue semejante a la de los ratones heterocigotos, es posible que esto se deba a que el gen WT tenga una dominancia y esta se presente sobre el HT (36).

En el estudio se observó que a los siete días de la instilación, la producción de colágena tiene una tendencia a ser más elevada en ratones HT, esto deberá analizarse en un futuro en ratones totalmente carentes de uPARAP/Endo 180.

APÉNDICE

Buffer de lisis para extracción de DNA (100 ml)

- 5 ml Tris pH 7.5, 1 M
- 10 ml EDTA pH 8, 0.5 M
- 2ml NaCl₂, 5 M
- 0.5 ml DDT 1.0 M
- 10 ml SDS, 10%

Aforar a 100 ml con H₂O dde

REFERENCIAS.

1. Pardo A, Selman M. Matriz Extracelular. En *Biología celular y molecular*. 1^a ed. (Jiménez LF & Merchant H eds.) p. 515-540. Pearson Educación, México. (2003).
2. 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).
3. Vuorio E & De Crombrughe B. (1990). *The family of collagen genes*. **Annu. Rev. Biochem.** 59, 837-872.
4. Heino J. (2007) *The collagen family members as cell adhesion proteins*. **Bioessays**. 29, 1001-1010. Review
5. Pardo A, Selman M (2006) *Matrix Metalloproteases in Aberrant Fibrotic Tissue Remodeling*. **Proc Am Thorac Soc**. 3, 383–388.
6. Boskovic J, Arnold JN, Stillion R, Gordon S, Sim RB, Rivera-Calzada A, Wienke D, Isacke CM, Martinez-Pomares L, Llorca O. (2006). *Structural model for the mannose receptor family uncovered by electron microscopy of Endo180 and the mannose receptor*. **J Biol Chem**. 281, 8780-87877.
7. East L, Isacke CM (2002) *The mannose receptor family*. **Biochim Biophys Acta**. 1572: 364-386. Review
8. Engelholm LH, List K, Netzel-Arnett S, Cukierman E, Mitola DJ, Aaronson H, Kjølner L, Larsen JK, Yamada KM, Strickland DK, Holmbeck K, Danø K, Birkedal-Hansen H, Behrendt N, Bugge TH (2003) *uPARAP/Endo180 is essential for cellular uptake of collagen and promotes fibroblast collagen adhesion*. **J Cell Biol**. 160, 1009-1015.

9. Rivera-Calzada A, Robertson D, MacFadyen JR, Boskovic J, Isacke CM, Llorca O (2003) *Three-dimensional interplay among the ligand-binding domains of the urokinase-plasminogen-activator-receptor-associated protein, Endo180*. **EMBO Rep.** 4, 807-812.
10. Kjøller L, Engelholm LH, Høyer-Hansen M, Danø K, Bugge TH, Behrendt N. (2004) *uPARAP/Endo180 directs lysosomal delivery and degradation of collagen IV*. **Exp Cell Res.** 293, 106-116.
11. Mousavi SA, Sato M, Sporstøl M, Smedsrød B, Berg T, Kojima N, Senoo H (2005) *Uptake of denatured collagen into hepatic stellate cells: evidence for the involvement of urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180*. **Biochem J.** 387, 39-46
12. Curino AC, Engelholm LH, Yamada SS, Holmbeck K, Lund LR, Molinolo AA, Behrendt N, Nielsen BS, Bugge TH. (2005) *Intracellular collagen degradation mediated by uPARAP/Endo180 is a major pathway of extracellular matrix turnover during malignancy*. **J Cell Biol.** 169, 977-985.
13. Madsen DH, Engelholm LH, Ingvarsen S, Hillig T, Wagenaar-Miller RA, Kjøller L, Gårdsvoll H, Høyer-Hansen G, Holmbeck K, Bugge TH, Behrendt N. (2007) *Extracellular Collagenases and the Endocytic Receptor, Urokinase Plasminogen Activator Receptor-associated Protein/Endo 180, Cooperate in Fibroblast-mediated Collagen Degradation*. **J Biol Chem.** 37, 27037-27045.
14. Isacke CM, van der Geer P, Hunter T, Trowbridge IS. (1990) *p180, a novel recycling transmembrane glycoprotein with restricted cell type expression*. **Mol Cell Biol.** 10, 2606–2618.
15. Howard MJ, Isacke CM. (2002) *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.

16. Wienke D, MacFadyen JR, Isacke CM. (2003) *Identification and characterization of the endocytic transmembrane glycoprotein Endo180 as a novel collagen receptor*. **Mol Biol Cell**.14. 3592–3604.
17. Ramzi S, Cotran MD. Inflamación aguda y crónica. En *Patología estructural y funcional*. 6^a ed. Mc Graw Hill Interamericana. p. 53-93 México (2001).
18. Parakrama Chandrasoma MD. Respuesta del huésped a la lesión. En *Patología general*. 3^a ed. El manual Moderno México. p. 39-93 México (1999).
19. Steven A, Lowe J. Sistema Inmunitario. De *Histología Humana*. 2^a ed. Harcourt Brace. P. 117-136. México. (1998).
20. Pérez TR. Patología general de la inflamación. De *Principios de patología*. 3^a ed. Médica Panamericana. p. 104-138 México (1990).
21. Ward PA, Hunnighake GW. (1998) Lung inflammation and fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**. 157, 123-129
22. Reynolds HY. (2005) Lung inflammation and Fibrosis an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. **Am Resp Crit Care Med**. 171, 98-102.
23. Lagente V Manoury B , Nénan S, Le Quément C, Martin-Chouly C, Boichot E. (2005) Role of matrix metalloproteinasas in the development of airway inflammation and remodeling. **Braz J Med Biol Res**. 38, 1521-1530.
24. Sheppard D. (2006) Transforming growth factor beta: A central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. **Proc Am Thorac Soc**. 3, 413-417.
25. Pardo A, Selman M, (2002). *Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis*. **Front Biosci**. 7, 1689-1707.

26. Pardo A, Selman M, (2002). *Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis*. **Int J Biochem Cell Biol.** 34, 1534-1538.
27. Selman M, Pardo A. (2002) *Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder*. **Respir Res.** 3 Review
28. Selman M, King TE, Pardo A. (2001) *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. **Ann Intern Med.** 134, 136-151. Review.
29. Cabrera BS. (2006) *Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar*. **Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.** 19, 53-61.
30. Woessner JF. (1961). *The determination of hidroxiprolina in tissue and protein samples containing small proportions of this aminoacid*. **Arch Biochem Biophys.** 93, 440-447.
31. Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Ramírez R, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Barrios R, Kala SV, Lieberman MW, Selman M.(2003). *Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice*. **Am J Respir Crit Care Med.** 167, 925-932.
32. Thrall RS, Barton RW, D'Amato DA, Sulavik SB. (1982). *Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat*. **Am Rev Respir Dis.** 126, 488–492.
33. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. (2002). *Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury*. **Cell.** 111, 635-646.

34. Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, Ramírez R, Jara P, D'Armiento J, Richards T, Selman M, Pardo A. (2007). *Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin*. **Int J Biochem Cell Biol.** 39, 2324-2338.
35. Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. (2005). *Pulmonary fibrosis: searching for model answers*. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 33, 9-13.
36. Gaytán F J. (2008). *Evaluación de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones deficientes de UPARAP/Endo 180*. Tesis de Licenciatura.