



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE
RATONES MUTANTES DEL GEN MMP-
19 POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE
PCR.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A

LUIS ANTONIO PLÁCIDO MÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. María de los Remedios Josefina
Ramírez Rangel

MÉXICO, D. F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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:

Caracterización genética de ratones mutantes del GEN MMP-19 por medio de la técnica de PCR.

realizado por Plácido Méndez Luis Antonio con número de cuenta 3-0230043-9 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Propietario M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

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

Tutora

Suplente Dr. Victor Manuel Ruiz López

Suplente Dr. Jorge Antonio García Alvarez

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 30 de septiembre de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

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.

'nlm.

**“When you make good things, good things
Happen”**

Agradecimientos

A tí papá por que siempre estas conmigo en lo buenos y malos momentos. Te amo y eres mí mejor ejemplo a seguir.

A tí mamá por que se que nos estas cuidando desde arriba. Nunca te olvidaremos.

A mis hermanos Selene y Maurício, por su apoyo incondicional en todo momento. Además de sus maravillosos hijos Tachuy y Maurício bebe.

A mis tíos de ambos lados de la familia, gracias por su ejemplo y apoyo.

A todos mis primos a los cuales quiero mucho.

A Reme, gracias por tus enseñanzas y apoyo para el desarrollo de esta tesis. Sí ya se que soy tu alumno favorito.

A Sandra por las clases teóricas y los consejos (meterme a inglés) que me fueron muy útiles para la carrera.

A Jorge por aclararme todas las dudas además de su amistad.

A la Dra. Annie Pardo por dejarme estar y aprender en su laboratorio además de brindarnos sus conocimientos cada miércoles en los seminarios.

Al Dr. Moisés Selman por su ejemplo de buen investigador y apoyo económico a través del SNI del CONACyT.

A todos mis sinodales Dra. Lourdes Segura, M. en C. Alfonso Vilchís y el Dr. Víctor Ruíz. Gracias por tomarse el tiempo de revisar este trabajo, sin sus observaciones no hubiera sido posible.

A mis amigos casi hermanos Ricardo y Blanca (mis compadritos), Juan "el gordo", Carlos "chiquilín", Axel "negro" (gracias por tu ayuda), Julieta "Chuleta", Aracely, Jessica, Aldo "la loba" y a los "perros of the bad" (Avid, Jesús, Miguel y Julio). Gracias por las grandes aventuras y apoyo, los quiero mucho Bros.

A mis amig@s y compañeros de la carrera Miguel, Iris, Sandra, Mónica, Samuel, Itzue, Fabiola y Mayra gracias su amistad y apoyo en las clases.

A la banda de las barras Oswaldo "El Pít", Joselo, Samanta, Erick "Ñerick", Roberto, Alfonso "El Poncho", Axa, "Bolígoma", Toño "carpologo", Raúl "Chispa", Emmanuel "El Rata" y mis Bichas Carmen, Male, Marisol y Natalia.

A Adrian y David por su amistad y compañía, sin ustedes no hubiera sido tan divertido trabajar en el laboratorio.

A mi querida UNAM por permitirme formar parte de ella.

Y por ultimo pero no menos importante a todas las ratas utilizadas en este proyecto, ya que literalmente sin sus colitas no hubiera sido posible este trabajo. Recordemos que todos los animales de laboratorio son nuestros héroes anónimos.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Composición de la MEC	2
Membranas Basales	9
Metaloproteinasas de la MEC (MMP's)	9
Metaloproteinasa -19 o RASI-I	15
Objetivo	17
Justificación	17
Métodos	17
Resultados	22
Discusión y conclusión	24
Apéndice	26
Abreviaturas	27
Bibliografía consultada	28

Abreviaturas

(MEC) Matriz extracelular	(SDS) dodecilsulfato sódico
(GAG's) Glicosaminoglicanos	(TIMP) Tissue Inhibitor of
(aa) Aminoácidos	Metalloproteinases
(Gly) Glicina	(RASI-1) Rheumatoid Arthritis Synovium
(PG) Proteoglicanos	Inflamed-I
(MMP) Matriz Metaloproteínasa	(MAPK) Mitogen Activated Protein
(Zn) Zinc	Kinase (RNA) Ácido Ribonucleico
(IGBP) Insulin-like Growth Factor-	(WT) Wild type
Binding Protein	(KO) Knockout
(IL- β) Interleucina Beta	(HT) heterocigoto
(FGF) Fibroblast Growth Factor	(RT-PCR) Reverse Transcriptase-
(TGF- β) Transforming Growth Factor	Polymerase Chain Reaction
Beta (CXCL5) Quimiosina con Motivo de	(μ l) Microlitro
Unión	(DNA) Ácido Desoxiribonucleico
(SDF) Stromal Cell-Derived Factor-1	(ml) Mililitro
(TNF) Tumor Necrosis Factor	(mM) Milimolar
(PDGF) Platelet-Derived Growth	(Pb) Pares de bases
Factor AA (IGF) Insuline Growth Factor	(H ₂ O dde) Agua Bidestilada y estéril;
(MT-MMP's) Membrane Type	(INER) Instituto Nacional de
Metalloproteinase	Enfermedades Respiratorias.

Resumen

La matriz extracelular (MEC) es una red intrínseca de proteínas fibrosas y polisacáridos que se encuentra ocupando el espacio extracelular presente en animales multicelulares manteniendo su integridad estructural y forma. En su conformación estructural esta compuesta en su mayoría por colágena y en menor cantidad GAG's, elastinas, proteoglicanos, glicoproteínas, fibronectina, laminina y entactina. La membrana basal es una estructura especializada en la MEC que separa a las células epiteliales y endoteliales del tejido conjuntivo. Los principales componentes de la membrana basal son la colágena tipo IV, la laminina, proteoglicanos heparán -sulfato y la entactina, los cuales interactúan entre sí para producir ensamblajes supramoleculares perfectamente definidas.

Las metaloproteinasas de matriz o matrixinas (MMP's) reciben este nombre debido a que su sitio catalítico contiene un metal (Zn). Las MMP's son las enzimas encargadas de degradar la MEC y componentes de la membrana basal, actualmente se han descrito 24 en vertebrados. Se ha demostrado que las MMP's están relacionadas en procesos biológicos como embriogénesis, morfogénesis de órganos, ovulación, dilatación cervical, angiogénesis, ciclo endometrial, migración celular y demás procesos biológicos. Además también participan en algunos procesos patológicos como artritis, ulceración de los tejidos, cáncer, aneurismos, nefritis, enfermedades cardiovasculares y fibrosis. Por lo que es importante el estudio de estas.

La MMP-19 o también conocida con el nombre de RASI-I (Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed-I), se descubrió como un autoantígeno en una porción de pacientes con artritis. Esta enzima contiene un total de 527 aminoácidos, además muestra una organización típica de una MMP soluble.

Se diseñó un ratón mutante el cual carece del gen MMP-19 (KO), encargado de la producción de esta enzima. Este ratón no presenta diferencias morfológicas, ni en el desarrollo en machos y hembras, por lo que es necesario saber el genotipo para distinguir los ratones KO de los WT y HT. Esta genotipificación se realizó utilizando técnicas de biología molecular como extracción de DNA y reacción en cadena de la polimerasa PCR, demostrando que la técnica de PCR es reproducible y eficiente para hacer genotipificación de estos organismos.

Sin olvidar que estos ratones serán utilizados en modelos experimentales en pulmón, y así conocer un poco más de la relación de esta enzima con la fibrosis pulmonar idiopática.

Introducción

Matriz extracelular.

La matriz extracelular (MEC) es una red intrínseca de proteínas fibrosas y polisacáridos que se encuentra ocupando el espacio extracelular presente en animales multicelulares manteniendo su integridad estructural y forma (Alberts *et al.*, 2002; Pardo, 1993). En el pasado se creía que esta red de proteínas era sólo una estructura de anclaje y soporte mecánico para las células. Ahora se sabe que la MEC está lejos de ser una estructura inerte, pues contiene factores de crecimiento y moléculas bioactivas además de sus proteínas obligadas, formando parte fundamental de procesos básicos como el desarrollo embrionario, la proliferación y migración celular, ya que crea un ambiente adecuado para estos (Pardo, 2003; Nagase *et al.*, 2006, Somerville *et al.*, 2003).

Las macromoléculas que constituyen la MEC son secretadas por células locales, en la mayor parte de los diferentes tipos de tejido conjuntivo estas macromoléculas son secretadas principalmente por fibroblastos (Alberts *et al.*, 2002).

Composición de la MEC

Como ya se mencionó la MEC está compuesta por proteínas fibrosas de dos tipos: estructurales (colágenas y elastina) y adhesivas (fibronectina y laminina); además de los polisacáridos llamados glicosaminoglicanos (GAG's), que reciben ese nombre debido a que uno de los dos azúcares en la repetición del disacárido es un aminoazúcar (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosiamina) (Alberts *et al.*, 2002).

Colágenas

Presentes en todos los animales multicelulares, son las proteínas más abundantes en mamíferos, representan hasta un 25% de su masa proteica. Las colágenas forman parte de una gran familia de proteínas de las cuales se han descrito 29 tipos (tabla 1), estas están presentes en diferentes órganos y tejidos así como en diferentes patologías. Su importancia radica en que son el componente de mayor proporción en la MEC, confiriéndole resistencia mecánica tanto a los tejidos como a los órganos (Alberts *et al.*, 2002; Pardo, 1993).

Las colágenas son secretadas por células del tejido conectivo (conjuntivo) y otros tipos celulares, son extremadamente ricas en los aminoácidos (aa) glicina, prolina e hidroxiprolina en sus cadenas polipeptídicas, los cuales son fundamentales para la formación de la triple hélice que constituye a estas proteínas. La función de la prolina es brindarle estabilidad y la de la glicina, al ser el aa más pequeño que existe, es posibilitar el giro de la triple hélice cada tres aa (figura 1), proporcionando a la cadena una secuencia repetitiva Gly-X-Y donde X y Y pueden ser cualquier aa, aunque comúnmente se encuentran prolina, hidroxiprolina o hidroxilisina, los cuales son aa resultado de eventos postraduccionales (Alberts *et al.*, 2002; Pardo, 1993).

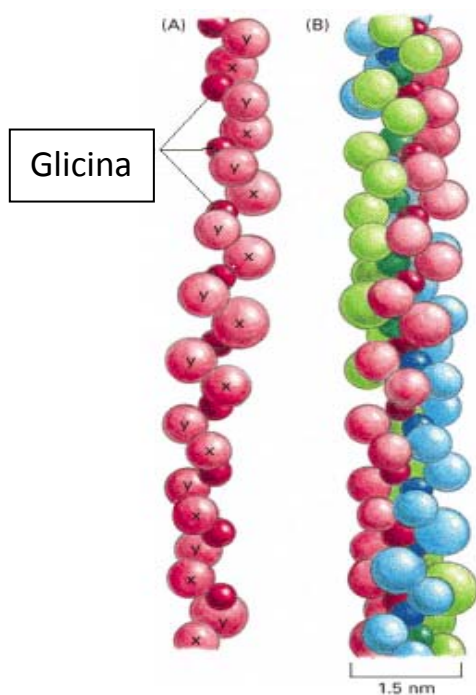


Fig. 1. Estructura de una molécula de colágena típica. (A) Modelo de una parte de una cadena α , en la cual cada aminoácido está representado por una esfera. (B) Modelo de una molécula de colágena en triple hélice, cada cadena α se muestra en un color diferente (Alberts *et al.*, 2002).

Tabla 1. **Tipos de colágena.** Tabla tomada y modificada de <http://en.Wikipedia.org/Wiki/collagen>.

Tipos de colágena	Distribución y características	Forma	Referencias
I	Es la colágena más abundante debido a que constituye aproximadamente el 90% de la colágena total del cuerpo. Se localiza en hueso, tendones, ligamento, dientes, cornea y piel.	Fibrilar	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
II	Constituye el 50% de la masa proteica del cartílago, además de también estar presente en notocorda y el humor vítreo del ojo.	fibrilar	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
III	Producida rápidamente por fibroblastos. Esta colágena la podemos encontrar en vasos sanguíneos, órganos internos y piel.	Fibrilar	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
IV	Esta proteína forma parte del sistema de filtración, además de también estar presente en lámina basal.	Reticular	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
V	Acompaña a la colágena tipo I en fibrillas heterotípicas. Se puede localizar en la placenta.	Fibrilar	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
VI	Filamentos en rosario de matrices del estroma que interactúan con fibrillas y células.	Filamentosa	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
VII	Filamentos de anclaje que se unen a membranas basales. La podemos encontrar en piel.	Fibras de anclaje	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
VIII	Sintetizada por células endoteliales, la podemos localizar en la cutícula de gusanos, así como también en el exoesqueleto de esponjas.	Redes hexagonales	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
IX	Se asocia con colágenas tipo II y XI, la podemos encontrar en cartílago hialino y humor vítreo.	Asociada a fibras	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
X	Localizada en Cartílago hipertrófico	Redes hexagonales	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.
XI	Asociado a colágena tipo II en fibras heterotípicas, en cartílago.	Fibrilar	Pardo, 1993; Jyrki, 2007.

XII	Relacionada con matrices que contienen colágena tipo I, localizada en tendón y piel.	Asociada a fibras	Pardo, 1993
XIII	Esta colágena interactúa con integrinas $\alpha 1$ y $\beta 1$, fibronectina y componentes de membranas basales, distribuida en células endoteliales.	Asociada a fibras	Pardo, 1993; Jyrki, 2007. Marja Riita, 2006.
XIV	Localizada en piel fetal y tendón.	Asociada a fibras	Pardo, 1993
XV	Estabiliza la estructura de las membranas.	Asociada a fibras	Myers <i>et al</i> , 2007
XVI	Asociada a proteínas de la matriz extracelular.	Asociada a fibras	Jyrki, 2007.
XVII	También conocida como BP180. La podemos localizar formando parte de las uniones de las células con la matriz.	Fibras	Jyrki, 2007.
XVIII	Asociada a alguna integrinas esta proteína participa en la estabilización de la estructura de las membranas.	Filamentosa	Jyrki, 2007.
XIX	Se localiza en algunas zonas de la membrana basal interaccionando con células vasculares, neuronales, mesenquimatosas y algunas epiteliales.	Asociada a fibras	Myers <i>et al</i> , 2003
XX	Es abundante en epitelio de cornea y en piel embrionaria.	Asociada a fibras	Koch <i>et al</i> , 2001
XXI	Actualmente esta colágena es utilizada en el estudio evolutivo de las colágenas FACIT debido a la divergencia que muestra en sus dominios.	Asociada a fibras	Tuckwell, 2002
XXII	Se encuentra depositada en membrana basal y además interacciona con los folículos del cabello, uniones del tendón y matriz extrafibrilar en cartílago.	Asociada a fibras	Koch <i>et al</i> ., 2004
XXIII	Participa en los sitios de unión célula -matriz	Asociada a fibras	Banyard <i>et al</i> ., 2003
XXIV	Contribuye a la regulación de la colágena tipo I, la podemos encontrar en el desarrollo de hueso y ojo.	Fibrilar	Koch <i>et al</i> ., 2003.
XXV	Relacionada con neuronas cerebrales.	Fibrilar	Tadafuni <i>et al</i> ., 2002.

XXVI	También conocida como HSP47, es una chaperona que reconoce y une varios tipos de colágena, en testículo y ovario.	Asociada a fibras	Keiji <i>et al.</i> , 2002
XXVII	Expresada por células epiteliales durante el desarrollo de varios tejidos como estomago, pulmón, gónadas y dientes.	Fibrilar	Handford <i>et al.</i> , 2003
XXVIII	Detectada en nervio siático, lamina basal de células de Shawn que rodean las fibras nerviosas. En ratón es poco secretada.	Filamentosa	Veit <i>et al.</i> , 2006
XXIX	Presente en placenta, órganos de origen embrionario, además de una alta expresión en pulmón, tracto gastrointestinal y sobre todo en piel.	Filamentosa	Soderhal <i>et al.</i> , 2007

Elastinas

La elastina es una proteína fuertemente hidrofóbica que se sintetiza en forma soluble. Se caracteriza por presentar una composición de aa muy peculiar, con un bajo contenido de residuos ácidos o básicos y una muy alta proporción de aa hidrofóbicos, especialmente valina (15%); sin embargo las propiedades fisicoquímicas responsables de la elastina no se conocen con precisión. Esta proteína presenta un alto grado de distensibilidad reversible e incluso tiene la capacidad de deformarse en grandes extensiones con pequeñas fuerzas. Las fibras elásticas desempeñan un papel fundamental en la estructura de las matrices intersticiales y en la organización tisular; dependiendo del tejido, otorgan la flexibilidad apropiada, y permiten la resistencia a los procesos de estiramiento. En este sentido, estas fibras se encuentran en cantidades significativas en aquellos tejidos en los cuales la extensibilidad reversible es importante en su función, como ocurre en el pulmón, la piel y las grandes arterias (Jiménez *et al.*, 2003).

Glicosaminoglicanos.

Los glicosaminoglicanos mejor conocidos como GAG's, son llamados así debido a que uno de cada dos residuos en la repetición del disacárido es siempre un aminoazúcar N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina y el segundo es Ácido urónico el cual le confiere la carga negativa a los GAG's. También debido a sus grupos carboxilo y

sulfato, los GAG's son aniónicos que les confiere turgencia a los tejidos (Alberts *et al.*, 2002).

Actualmente los GAG's son representados por 4 grupos: ácido hialurónico, Condrotin y Dermatán sulfato, Heparán sulfato y Keratan sulfato. (Alberts *et al.*, 2002)

Proteoglicanos.

Los proteoglicanos (PG) como su nombre lo dice están compuestos por una proteína rica en los aa. serina y treonina la cual tiene unida una o más cadenas de GAG's por uniones covalentes, ocupan hasta un 90% del peso total de la macromolécula (Alberts *et al.*, 2002).

Existen diferentes tipos de PG, pero el más común de estos es el agregano el cual es componente fundamental del cartílago y tejido conectivo unido al ácido hialurónico. Los PG al igual que los demás componentes de la MEC son muy importantes no solo funcionalmente sino también estructuralmente pues estos le confieren su estado de coloide, ya que las cadenas de GAG's que están unidas a la proteína central son hidrofílicas lo que hace que retengan agua.

Los proteoglicanos se asemejan a polisacáridos más que a proteínas por cuanto los carbohidratos constituyen más del 95% del peso de su molécula, actúan como lubricantes y componentes estructurales del tejido conjuntivo; intervienen en la adhesión de las células a la matriz extracelular y se unen a los factores que estimulan la proliferación celular (Strayer, 2004).

Glicoproteínas.

Los azúcares pueden unirse de forma covalente a proteínas para formar glicoproteínas. Los carbohidratos están presentes en un porcentaje mucho menor que en los proteoglicanos. Muchas glicoproteínas son componentes de las membranas celulares, donde ejercen una serie de funciones en procesos tales como la adhesión celular. Un ejemplo de éstas es la Fibronectina (Jiménez *et al* 2003).

Fibronectina

Glicoproteína presente en todos los vertebrados, debido a que es una proteína importante para la adhesión y migración celular durante el desarrollo embrionario de los vertebrados. Está compuesta por 2 largas subunidades unidas por puentes disulfuro, además de segmentos funcionales y no funcionales, sitios de unión a colágena y heparina, además de una secuencia para unión celular la cual es conocida como la secuencia RGD (arg-gly-asp). Debido a su gran importancia en los procesos biológicos como embriogénesis y organogénesis esta proteína es fundamental para la homeostasis de los organismos. (Alberts *et al.*, 2002; Bostman *et al* 2003).

Laminina

La laminina es una glicoproteína compuesta por tres cadenas polipeptídicas (alfa-beta- gama) formando una especie de cruz, altamente glicosilada ya que del 15% al 30% de su masa total son carbohidratos. Se localiza casi exclusivamente en la lámina basal con sitios de unión a colágena tipo IV, entactina y membrana celular, teniendo efecto sobre las células adyacentes ya que por sus características interviene en migración, diferenciación y la adhesión celular debido a que las integrinas reconocen la cadena alfa de la laminina (Alberts *et al.*, 2002; Jiménez *et al* 2003)

Entactina

Es una glicoproteína sulfatada asimétrica también llamada nidogeno, con tres estructuras globulares, que se encuentra formando parte de la membrana basal, y junto con la laminina y colágena tipo IV forma un complejo estable. Interviene en procesos biológicos como la adhesión y migración celular. (Jiménez *et al* 2003)

Membranas basales

La membrana basal es una estructura especializada en la MEC que separa a las células epiteliales y endoteliales del tejido conjuntivo. Este tipo particular de matriz extracelular organiza y ejerce influencia sobre el comportamiento de las células, regulación que esta mediada por la interacción de moléculas específicas de la

membrana basal con la superficie celular; así mismo, forma una barrera al pasaje de proteínas y células.

Los principales componentes de la membrana basal son la colágena tipo IV, la laminina, proteoglicanos heparán -sulfato y la entactina, los cuales interactúan entre sí para producir ensamblajes supramoleculares perfectamente definidos, que tienen el potencial de generar una diversidad de estructuras laminares en diferentes órganos como riñón, vasos sanguíneos, pulmón y músculo. Las alteraciones de las láminas basales se asocian con varios procesos patológicos, que incluyen algunas enfermedades fibrosantes (Jiménez *et al* 2003).

Metaloproteinasas de la matriz extracelular.

Las metaloproteinasas de matriz o matrixinas (MMP's) reciben este nombre debido a que su sitio catalítico contiene un metal (Zn). Las MMP's son las enzimas encargadas de degradar la MEC. Actualmente se han descrito 24 MMP's en vertebrados de estas 23 están en el humano, desde su descubrimiento en la cola de renacuajo (Visse *et al.*, 2003), pero no son proteínas exclusivas de vertebrados, ya que también se han descrito en erizo de mar, *Drosophila melanogaster*, hidra, virus, bacterias, nematodos y hasta en plantas.

Las MMP's no solo tienen la función de degradar la MEC ya que también participan en procesos biológicos como desarrollo embrionario, morfogénesis de órganos, ovulación, dilatación cervical, angiogénesis, ciclo endometrial, remodelación de hueso, reparación de los tejidos, migración celular y demás procesos biológicos (Brew *et al.*, 2000; Maskos 2005); así como también en algunos procesos patológicos como artritis, ulceración de los tejidos, cáncer, aneurismos, nefritis, enfermedades cardiovasculares y fibrosis (Brew *et al.*, 2000; Visse *et al.*, 2003; Pardo *et.*, al 2006).

TABLA 2. Familia de las Metaloproteinasas. Tomada y modificada de (Somerville *et al* 2003)

Número de proteasa y nombre alternativo	Sustratos de la MEC	Otras moléculas con las que interactúa
MMP-1 ó colagenasa 1	Colágena tipo I, II, III, VII y VIII, gelatina, agregano, entactina, tenascina y perlecano	α -1antiquimotripsina, α -1antitripsina, IGFBP-3, IGFBP-5, IL- β 1, ovostatina,

		proMMP1y 2
MMP-2, Gelatinasa A ó Gelatinasa 2	Colágena tipo I, IV, V, VII, X, XI, XIV, gelatina, agregano, elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanos	FGF RI, IGF-BP3, IGF-BP5, IL-1 β , TGF- β , proMMP- 1,2 y 13
MMP-3 ó estromelisina-1	Colágena tipo II, IV, IX; X gelatina, agregano, decorina, elastina, fibronectina, laminina y proteoglicanos	α - 1antiquimotripsina, E-caderina, IL- β 1, ovostatina, fibrinogeno, proMMP-1, 3, 7, 8, 9 y 13
MMP-7, Matrilisina 1 ó PUMP	Colágena tipo I, II, III, V, XIV agregano, elastina, enactina y laminina	E-caderina, plasminógeno, proMMP- 1,2,7,8 y 9
MMP-8, colagenasa 2 ó colagenasa de neutrófilos.	Colágena tipo I, II, III, V, VIII, X, gelatina, agregano, laminina	α 2 antiplasmina y proMMP-8
MMP-9, Gelatinasa B ó Gelatinasa 9	Colágena tipo IV, V, VII, X, XIV, fibronectina, laminina y proteoglicano	CXCL5, IL-1 β , IL2-R, SDF-I y TGF- β
MMP-10, estromelisina 2 ó Transina 2	Colágena tipo III, IV, V, gelatina, fibronectina, laminina	proMMP-1, 8 y 10
MMP-11 ó estromelisina 3	Laminina	α - 1antitripsina y IGFBP-1
MMP-12 ó metaloelastasa de macrófago	Elastina	Plasminógeno
MMP-13 ó colagenasa 3 colagenasa de rata	Colágena tipo I, II, III, IV, V, IX, X, XI, gelatina, agregano, fibronectina y laminina	Activador 2 del plasminógeno, proMMP-9, 13 y SDF-I
MMP-14 ó MT1-MMP	Colágena tipo I, II, III, gelatina, fibronectina,laminina, agregano	Integrina α v β 3, proMMP- 2 y 13, proTNF α , SDF1 y transglutaminasa de tejido
MMP-15 ó MT2-MMP	Colágena tipo I, II, III, gelatina, agregano, fibronectina, laminina,	proMMP-2 y 13 transglutaminasa de tejido
MMP-16 ó MT3-MMP	Colágena tipo I, III, gelatina, agregano, fibronectina,	proMMP-2 y 13

	laminina,	
MMP-17 ó MT4-MMP	Gelatina y fibronectina	proMMP-2 y pro TNF- α
MMP-19 ó RASI-I	colágena tipo IV, laminina, nidogeno, large tenascina-C, fibronectina, gelatina tipo I, agrecano y cartílago oligomérico.	IGF
MMP20 ó Enamelisina	Agrecano, amelogenina	
MMP-21	Sustratos no definidos	α - 1antitripsina
MMP-23 ó CA- MMP	Gelatina	
MMP24 ó MT5-MMP	Gelatina, fibronectina	proMMP-2 y 13
MMP-25, Leucolisina ó MT6-MMP	Colágena tipo IV, gelatina, fibronectina,	proMMP-2
MMP-26 ó Matrilisina2	Colágena tipo IV, gelatina, fibronectina	β 1 proteinasa inhibidor
MMP-28 ó Epilisina	Sustratos no definidos	Caseína

Estructura de las MMP's

La estructura de las MMP's es un fiel reflejo de la cercana relación y evolución de las MMP's, debido a la conservación de sus dominios y estructura además de otros mecanismos como catálisis y regulación (*Somerville et al 2003*).

Existen dos tipos de MMP's, las que son secretadas hacia el exterior de la célula y las que se encuentran unidas a la membrana, también conocidas como MT-MMP's.

Las MMP's que son secretadas hacia el exterior, su conformación consiste en 2 dominios conectados por un péptido flexible y rico en prolina, excepto la 7 y la 26 que son las MMP's más simples en cuanto a número de dominios se refiere, como se muestra en la figura 2.

En cuanto a las MT-MMP's (que son la 14,15,16,17,24 y 25) se encuentran unidas a la membrana por un pequeño dominio transmembranal seguido por un pequeño y muy conservado segmento citosólico de 20 aa., como se muestra en la figura 2. Estas

MMP's son importantes para las células que están en constante migración debido a que estas funcionan para ir degradando la MEC que este a su paso (Somerville et al 2003).

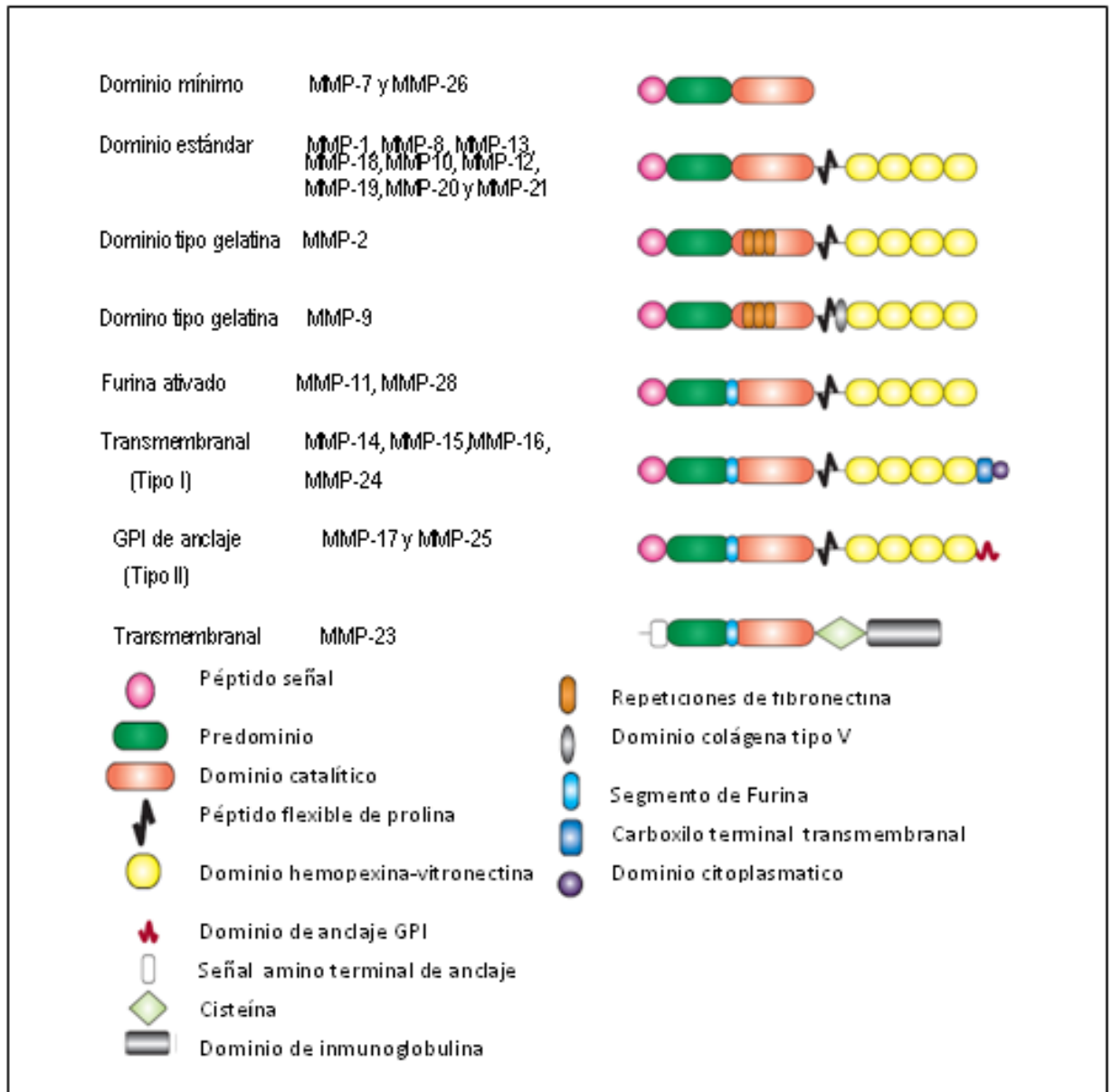


Figura 2. Diferentes tipos de MMP's, tomada y modificada (Somerville et al., 2003)

Activación

Todas las MMP's son secretadas en forma de zimógeno lo cual quiere decir que son inactivas, debido al prodominio que llevan unido a su sitio catalítico por medio de un grupo tiol no pareado en el carboxilo terminal de una cisteína. Esta cisteína actúa

como un inactivador de los 4 ligandos para el átomo catalítico de Zn, resultando en la exclusión del agua y por lo tanto la inactividad de la enzima Figura.3

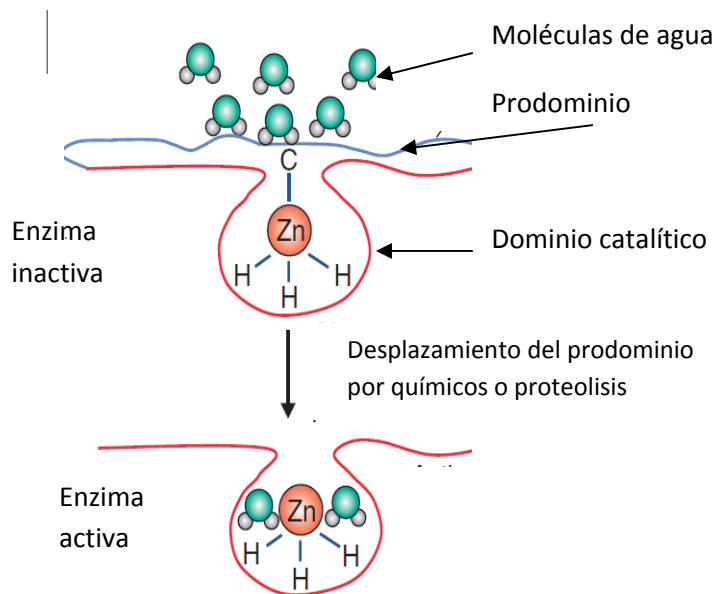


Figura 3. Activación de las MMP's tomada y modificada (Somerville *et al.*, 2003)

Para que la enzima pueda ser activada, la unión entre la Cys y el Zn tiene que ser separada por un cambio conformacional o proteólisis. Aunque también esta activación puede ser por medio de otras proteinasas o in Vitro por algunos agentes químicos como agentes tiol modificados, SDS, oxígenos reactivos, bajo pH y tratamientos de calor figura 3. (Visse *et al.*, 2003).

Regulación

Las MMP's por lógica no pueden estar activas todo el tiempo debido a que estarían degradando la MEC sin detenerse, por lo que tienen cuatro inhibidores específicos en vertebrados llamados TIMP's- 1, 2, 3 y 4 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) de los cuales los TIMP's-1,2 y 4 son proteínas de secreción, mientras que el TIMP-3 se encuentra anclado a la MEC, los cuales inactivan a las MMP's formando complejos enzimáticos 1:1 desplazando las moléculas de agua regresándola a su forma inactiva. (Stetler *et al* 2008)

Pero no solo los TIMP's se encargan de la regulación de las MMP's ya que se ha comprobado que algunos inhibidores de proteasas generales como la α 2-macroglobulina principalmente bloquea a las MMP's en el plasma y fluidos tisulares.

Sin embargo se ha observado que algunas proteínas recientemente descritas también inhiben a las MMP's y por lo que se ha descrito de ellas presentan grandes similitudes con el N-terminal de los TIMP's. (Brew *et al.*, 2000; Visse *et al.*, 2003).

Matriz metaloproteinasas – 19 RASI-1 (MMP-19)

La MMP-19 también conocida con el nombre de RASI-I (Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed-I), se descubrió como un autoantígeno en una porción de pacientes con artritis. Por algún tiempo se pensó que ésta y la MMP-18 eran distintas, pero por medio de diferentes análisis de bases de datos se supo que eran la misma enzima, conservando el nombre de MMP-19 o RASI-I. El gen de esta proteasa en ratón se localiza en el cromosoma 10 en la posición 12q14. Contiene un total de 527 aminoácidos, además muestra una organización típica de una MMP soluble, incluyendo un péptido señal, un prodominio con su residuo de Cys (esencial para mantenerla en su estado latente) un dominio catalítico con su motivo típico de unión a Zn y un dominio tipo hemopexina; igualmente posee características que la hacen distinta de otras MMP's como una inserción de cinco residuos de ácido glutámico en la región de unión; también tiene un motivo raro de latencia en el prodominio y un residuo adicional de Cys en la región catalítica, sin olvidar que no tiene Asp. Por estas características tan especiales se cree que podría ser el primer miembro de una nueva subfamilia de MMP's (Pendas *et al.*, 2004; Misung Jo *et al.*, 2004; Caterina *et al.*, 2000; Kolb *et al.*, 1997).

Como ya se había mencionado todas las MMP's son secretadas en forma de zimógeno y de alguna forma tienen que ser activadas, ya sea por proteólisis o por cambios conformacionales. A diferencia con otras MMP's el zimógeno de la MMP-19 es activado *in vivo* por autoproteólisis e *in vitro* se puede activar por medio de un tratamiento de tripsina, se ha observado que esta MMP no es capaz de activar otras MMP's (Hietala *et al.*, 2003; Impola *et al.*, 2003; Pendas *et al.*, 1997)

La MMP-19 es ampliamente distribuida en varios tejidos humanos normales como pulmón, intestino, páncreas, bazo, ovario y placenta. En comparación con otros tejidos como cerebro, ojos, riñones, músculo liso y timo es poco expresada. Páncreas solo tienen un modesto nivel de MMP19 en ratones, mientras que en humanos su expresión es alta. En cuanto a tipos celulares esta enzima se expresa constitutivamente en células vasculares de músculo liso, macrófagos, células endoteliales, células mioepiteliales y queratinocitos basales, además de ser expresada en condiciones patológicas en diferentes órganos y tejidos como artritis donde esta MMP juega un papel importante ya que es la encargada de degradar la MEC y el cartílago de las articulaciones, además de liberar diferentes factores de crecimiento y unir los receptores de la familia TNF lo que ayuda a la degradación del tejido, en el tejido sinovial degradado, la MMP-19 es sobre expresada además de estar presente en pacientes con artritis temprana, al mismo tiempo de estar relacionada con la

angiogénesis durante la inflamación de este, al igual que en diferentes condiciones inflamatorias la MMP-19 está presente en lesiones del epitelio mamario, durante la inflamación del intestino delgado RAS-I es expresada por macrófagos, fibroblastos y mucosa del epitelio sugiriendo que esta MMP induce inflamación en respuesta a citocinas inflamatorias para restaurar la mucosa y el epitelio del intestino la MMP19 se observó en pacientes recién nacidos de manera prematura con una enfermedad gastrointestinal llamada NEC (enterocolitis necrotizante, con una tasa de mortalidad general del 20% al 30%) que se caracteriza histológicamente por una extensa lesión tisular y amplia inflamación fue detectada por un anticuerpo específico para esta enzima en la cripta del epitelio.

En disco intervertebral como otras MMP's la MMP-19 libera factores de crecimiento, en este caso IGF-I el cual tiene una función crítica ya que en las células de esta estructura funciona como un mitógeno además de tener efectos antiapoptóticos lo cual conlleva a la deformación de los discos. En la piel la MMP-19 también es expresada por células inflamatorias como monocitos y macrófagos, además que debido a su actividad degradadora se piensa que tal vez crea microambientes que permiten el crecimiento de células tumorales, normalmente la MMP-19 no está presente en cerebro aunque se observó que en glioblastomas (tumores cerebrales primarios) existe un aumento de su expresión lo cual está relacionado con el aumento de grado del tumor, según con la clasificación del tumor de la OMS, no solo en la cantidad de expresión sino también en el número de muestras tumorales detectables con la expresión del RNAm (Mauch et al., 2003; Misung Jo et al., 2004; Beck et al 2008; Mysliwy et al., 2006; Kolb et al 1999, H. Gruber; Bister et al 2005)

El dominio catalítico de la MMP-19 hidroliza o degrada componentes de membrana basal como colágena tipo IV, laminina, nidógeno, tenascina-C, fibronectina, gelatina tipo I, además de dos componentes de cartílago llamados agregano y cartílago oligomérico. En años recientes se ha observado que la MMP-19 procesa el IGF (Insuline Growth Factor) uniéndolo con la proteína IGFBP-3 en piel. En contraste su actividad catalítica es inhibida por los TIMP's -2, 3, 4 y menos eficientemente el TIMP-1. (Hieta et al., 2003; Stracke et al., 2000; Titz et al., 2004; Sadowski et al., 2005; Mysliwy et al., 2005)

Se ha demostrado que la MMP-19 está potencialmente aumentada en cultivos in vitro por una citosina llamada TNF- α (Tumor Necrosis Factor), mediada vía extracelular por las kinasas 1/2 y P38 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Esta citosina es producida por una variedad de tipos celulares como macrófagos, queratinocitos, mastocitos y células T por lo que la presencia de estos tipos celulares pueden estimular su producción y expresión en diferentes órganos; además del TNF- α , moléculas como TGF- β , EGF y PDGF estimulan la producción de MMP-19. Se ha observado que en cuanto aumenta la actividad proteolítica de esta enzima, aumenta el número de

queratinocitos debido a que su catálisis contribuye a la migración (Hieta et al., 2003; Beck et al.,2007).

Objetivo.

Realizar la caracterización genética de ratones a los que se les eliminó el gen para la MMP-19 (knockout), para distinguirlos de los individuos silvestres (wild type), así como de los heterocigotos, utilizando técnicas de biología molecular como extracción de DNA y reacción en cadena de la polimerasa PCR.

Justificación.

Al realizar la caracterización genética de los ratones mutantes del gen MMP-19, estos podrán ser utilizados en algunos modelos experimentales de proyectos de posgrado encaminados a conocer la función de la MMP-19 *in vivo* en patologías pulmonares, mediante modelos de estudio.

Métodos

Los ratones utilizados en esta genotipificación fueron donados por un grupo de trabajo de la Universidad de Oviedo en España (Pendas *et al.*, 2004). Estos ratones fueron generados para conocer las funciones de la MMP-19 *in vivo* por lo que reindujo una mutación en el gen MMP-19 de estos ratones. Se obtuvo una clona genómica de un ratón 129-SV/J de una biblioteca genómica, además de usar un vector blanco previamente diseñado para remover la región promotora y los exones 1 y 2 endógenos con un cassette de neomicina. El vector blanco fue alineado por electroporación en células HM-I ES y se insertaron en óvulos de ratones hembra C57BL6. Los heterocigotos de la primera generación F1 los cuales fueron identificados por la técnica southern blot para después cruzarlos y obtener el ratón transgénico los cuales fueron identificados por análisis de northern blot de un total de RNA de diferentes tejidos de wild type (WT) y Knockout (KO) lo cual reveló que la transcripción en el homocigoto KO era inexistente, los mismos resultados fueron obtenidos por RT-PCR.

Los ratones deficientes de MMP-19 mostraron un desarrollo normal, tanto machos como hembras no tenían problemas de fertilidad. Prácticamente no se detectaron diferencias entre los WT y los KO. En cuanto a los ratones KO no mostraron otro fenotipo y su rango de vida no tenía diferencia distinguibles con los WT. Finalmente los análisis histológicos no mostraron diferencias entre los tejidos de los ratones KO y los WT. (Pendas *et al.*, 2004)

Extracción de DNA

- 1.- Se corta y rasura aproximadamente 1-1.5cm de la cola del ratón, posteriormente se enjuaga con agua DEPC y con agua estéril para retirar el pelo que pudo haber quedado.
- 2.- Cortamos la cola en pequeños fragmentos con ayuda de un bisturí y unas pinzas de disección, todos los pequeños trozos se introducen en un tubo centrifuga de 1.5ml.
- 3.- Adicionamos 500µl de solución de lisis y 20 µl de proteinasa K (10mg/ml) poniéndola en el agitación vigorosa unos cuantos segundos.
- 4.- Posteriormente incubar los tubos a 55°C toda noche.

5.- Centrifugar a 1000rpm/1min y se recupera el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf, Que lleva este sobrenadante

6.-Para precipitar el DNA se adiciona 1ml de etanol absoluto

7.-Centrifugar a 1000rpm/1min y con una micropipeta de 1000µl se retira el sobrenadante.

8.-Se le adiciona 700µl de etanol al 70% y se centrifuga a 1000rpm/1min para recupera el precipitado.

9.-Permitir que se seque el DNA y posteriormente se agrega 150µl de Agua bidestilada. Incubar por lo menos 8hrs en agitación constante a 55 °C .

Para poder observar la calidad de nuestro DNA se hicieron geles de agarosa al 0.7% con buffer TAE 1X, más 5µl de bromuro de etidio, donde se cargó la 1µl + 0.5µl de colorante (blue juice de Gibco) se corrió en una cámara de electroforesis, con una corriente constante de 72 volts por aproximadamente 40min, el cual se observó en el transiluminador modelo GVM20 de la marca Syngen.

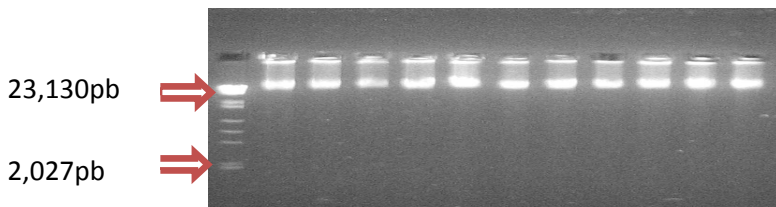


Figura 4. Extracción de DNA en buenas condiciones, pues no muestra ningún barrido, el cual es un indicativo de degradación. Carril 1 marcado de pesos moleculares λ Hind II, 2-11 ADN de muestras experimentales.

Cuantificación de DNA por espectrofotometría

Se determinó la concentración del DNA con el espectrofotómetro modelo DU-64 de la marca Beckman, poniendo en una celda 1µl/1ml de agua, midiendo en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260nm.

Para calcular el DNA se utiliza la siguiente fórmula:

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

La concentración ideal de DNA es de 100ng/μl para hacer la reacción en cadena de la polimerasa

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para hacer la reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction) se prepara una mezcla con los siguientes elementos utilizando primers específicos para el gen de la MMP-19 Knockout KO (-/-) y wild type (WT) (+/+)

- KOMMP19 Sense (5´- 3´) TCAAAACACGCAAAGTTGGA
- KOMMP19 Anti-Sense (5´- 3´) ATGTGTGTTTGGCCTGAGTG
- MMP19NEO Sense (5´- 3´) TCGGCCATTGAACAAGATGG
- MMP19NEO Anti-Sense (5´- 3´) GAGCAAGGTGAGATGACAGG

Tabla 3 Componentes y cantidades de la mezcla de reacción de PCR, para primers WT y KO

Reactivos (concentración inicial)	1x [concentración final]
Buffer 10x	.7 μl [.28x]
dNTPs [100mM]	1.25 μl [5mM]
Primer Sens [50mM]	1.5 μl [3mM]
Primer Anti- sens [50mM]	1.5 μl [3mM]
Cloruro de Magnesio MgCl ₂ [50mM]	2.0 μl [4mM]
Enzima Taq polimerasa [500U] (5U/ μl)	0.25 μl [1.25U]
Agua H ₂ O	16.8 μl
DNA	1.0 μl [100ng]
Volumen final de la mezcla	25 μl

Se utilizó el termociclador modelo PCR System 2400, de la marca Perkn Elmer.

Condiciones para la amplificación del gen KO

95.0c	94.0c	58.0c	72.0c	72.0c	4.0c
2:00min	0:20seg	0:20seg	0:25seg	5:00min	∞

Condiciones para la amplificación del gen WT

95.0c	94.0c	60.0c	72.0c	72.0c	4.0c
2:00min	0:35seg	0:35seg	0:35seg	5:00min	∞

Para poder ver los resultados se prepararon geles de agarosa al 2.5% con solución TAE 1X, mas 5µl de bromuro (0.5µl/ml) de etidio en una cámara de electroforesis, donde el gel se corre con una corriente constante de 72 volts por aproximadamente 40min.

Determinación del genotipo

Para determinar el genotipo de los ratones, una vez que el gel de agarosa al 2.5% fue corrido, se observa en el transiluminador para determinar el genotipo, donde el gen KO (327pb), WT (211pb) y en el caso de que el organismo fuera heterocigoto presenta las dos bandas.

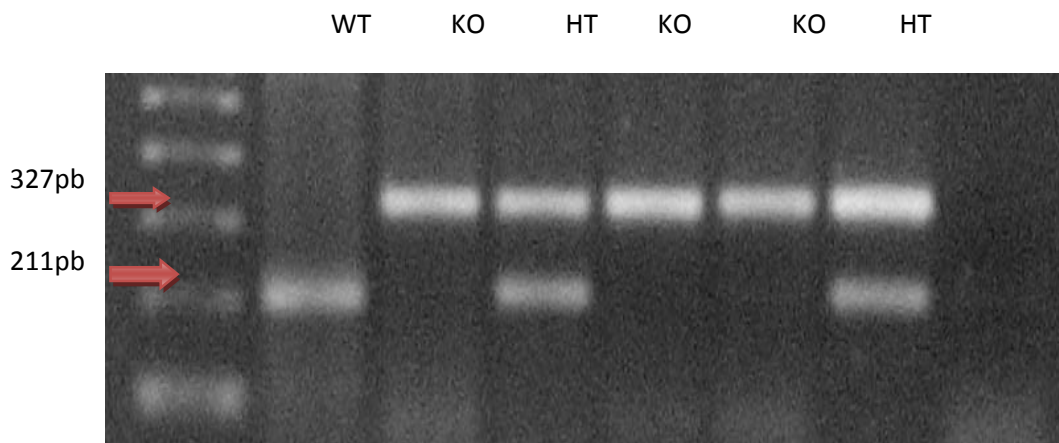
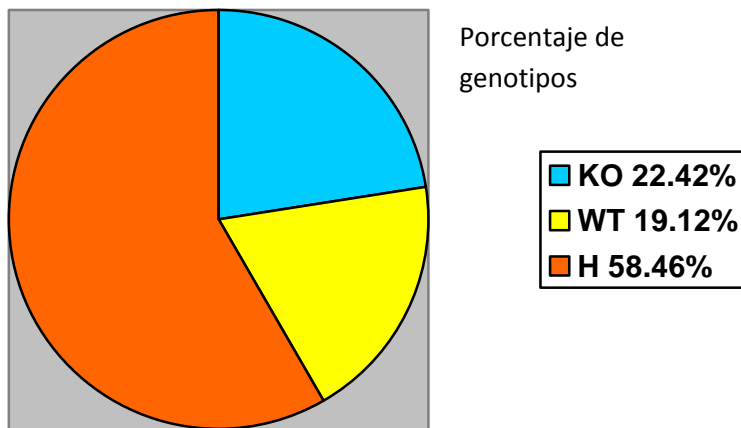


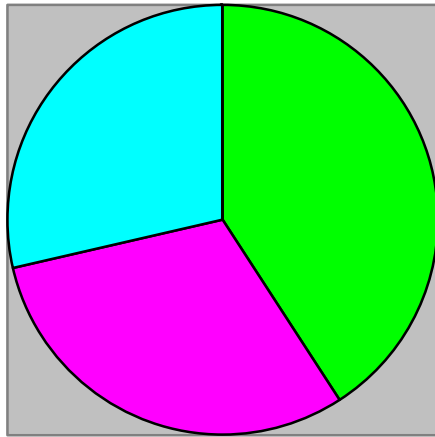
Figura 5. Gel de electroforesis donde se muestra en el carril 1 pesos moleculares 100bp DNA Ladder, carril 2 WT (211pb), carriles 3,5-6 KO (327pb) y carriles 4 y 7 HT muestran las 2 bandas.

Resultados

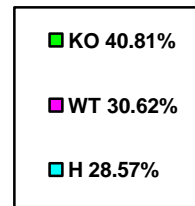
Los ratones utilizados en esta caracterización, fueron donados por un grupo de trabajo de la Universidad de Oviedo en España, llegando al bioterio del INER en la octava generación (grupo puro) los cuales se comenzaron a reproducir entre si para obtener mas ratones WT y KO, además de hacer otro grupo (F8) de ratones a los cuales se les enriquecía la variación genética cruzándolos con otros ratones que no estaban relacionados genéticamente con los ratones que fueron donados por la Universidad de Oviedo.



En total fueron caracterizados 183 ratones de ambos grupos (puros y F8), de los cuales fueron 22.42% KO, el 19.12% WT y el 58.46% H, lo cual concuerda con las proporciones genéticas mendelianas.



Porcentaje de genotipos del grupo puro



En cuanto al grupo puro fueron caracterizados 51 ratones, de los cuales fueron 40.81% KO, 30.62% WT y 28.57% H, estos ratones no cumplen las proporciones mendelianas, pero recordemos que a este grupo no se le esta aumentando la variación genética, por lo que stos ratones tienden al efecto cuello de botella en el cual todos los organismos tienden a morir después de varias generaciones debido a la falta de dicha variación genética.

RATONES	KO	WT	H
♂	19	21	38
♀	22	12	71
TOTAL	41	33	109

Tabla. 4. sexo de los ratones y su genotipo

Discusión y conclusión.

La utilización de la metodología propuesta para la caracterización genética de los ratones mutantes del gen MMP-19 resultó satisfactoria ya que se demostró que la técnica, (en este caso la Reacción en Cadena de la Polimerasa) fue eficiente y reproducible para la caracterización genética de los ratones mutantes del MMP-19. En comparación con las técnicas de southern blot northern blot con las cuales también se pudo haber llevado a cabo la caracterización. La técnica de PCR resulta mejor debido a que en ningún momento se necesita utilizar radioactividad (como es en el caso de las técnicas de northern y southern que la utilizan para marcar las sondas), en cuanto a costos la técnica de PCR resulta ser mucho más barata y eficiente debido a que las sondas que utilizan las técnicas de northern y southern blot superan por mucho el precio de los primers, en cuanto a eficiencia la técnica de PCR tiene componentes más “sencillos” de preparar además del tiempo que implica la preparación de los mismos y por último además del tiempo invertido en la preparación del material para la técnica, la realización de la misma lleva menos tiempo con el PCR.

Cabe recalcar que solo se utilizó un pequeño fragmento de la cola del organismo, por lo que los organismos podían ser utilizados en diferentes modelos experimentales ya que no se daña ningún otro órgano o tejido, así que prácticamente se puede llevar a cabo cualquier modelo experimental en cualquier órgano o tejido de esta colonia ratones. Como fue el caso de varios modelos experimentales realizados con los pulmones de estos organismos en cultivos celulares para poder saber si la MMP-19 tiene alguna relación con la migración celular, apoptosis entre otras, además de ver las implicaciones que esta metaloproteinasa tiene con la fibrosis pulmonar que es el objeto de estudio de este grupo de trabajo.

Sin olvidar que esta caracterización fue importante debido a que los ratones no muestran diferencias morfológicas ni de desarrollo en comparación con los ratones silvestres por lo que esto ayudó a distinguir a cada uno de los organismos utilizados en diferentes modelos experimentales y así aumentar más el conocimiento sobre esta metaloproteinasa. Aunque se podría pensar que el gen de la MMP-19 no es importante para el organismo debido a que no muestra diferencias muy notables, sin

embargo aun se desconoce mucho de las posibles vías de señalización en las que pueda estar relacionada esta proteína o las interacciones celulares que esta pueda tener, por lo que es importante seguir con el estudio de estos organismos.

En cuanto al grupo puro, el cual es el grupo traído de España actualmente en el bioterio del INER, cuenta con pocos individuos en su población, además recordemos que no se le proporciono variación genética, (es decir solo se cruzaron entre ellos mismos sin la introducción de nuevos organismos que ayudaran a aumentar la variación genética) por lo que tal vez no cumplen con las proporciones mendelianas y tiendan a ser KO o WT, sin olvidar que la falta de variación genética y el poco numero de organismos hace que estos organismos tiendan a lo que es conocido como efecto cuello de botella, lo cual hace que estos ratones tiendan a ser más vulnerables a enfermedades conforme van avanzando las generaciones a tal grado que podrían desaparecer.

Apéndice

Solución de lisis para extracción de DNA (100ml)

5ml Tris pH 7.5 1M
10ml EDTA pH 8.5M
2ml NaCl 5M
0.5ml DDT 1.0M
10ml SDS, 10%
Aforar a 100 ml con H₂O dde

Solucion TAE 50X

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

Gel de agarosa al 2.5%

0.5gr de agarosa
20ml de buffer TAE 1X
5 μ l de Bromuro de etidio.

Nota para el gel de agarosa al 0.7% solo cambia de 0.5gr a 0.140gr de agarosa

Bibliografía consultada

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. Cell Junctions, cell adhesion and the extracellular matrix. En ***Molecular Biology of the Cell***. 4a ed. p. 949-1010. Garland Science, Nueva York & London, 2002.
2. Lubert Stryer, Jeremy M. Berg and John L. Tymoczko. Carbohidratos. En ***Bioquímica*** 5a ed. 306-318. Editorial Reverte, Barcelona España. 2002
3. Jiménez LF y Merchant H eds. ***Biología celular y molecular***. 1ª ed. p. 515-540. Pearson Educación, México 2003.
4. Fred T Bosman and Ivan Stamenkovic. Functional structure and composition of the extracellular matrix. ***J Pathol*** 200: 423-428, 2003.
5. Pardo, A. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. ***Rev Inst Nat Enf Res Mex*** 6: 156-164, 1993.
6. H. Nagase, R Visse and G Murphy. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. ***Cardio Res*** 69: 5562-563, 2006.
7. Robert PT Somerville, Samantha A Oblander and Suneel S Apte. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. ***Gen Bio*** 4: 216.1-216.11, 2003.
8. Jyrki Heinoa, Mikko Huhtala, Jarmo Käpylä and Mark S. Johnsonb. Evolution of collagen-based adhesion systems. ***Int J Biochem and Cell Biol*** XXX: 1-8, 2007.
9. Marja-Riitta Vaisanen, Timo Vaisanen, Hongmin, Paivi Pirila, Raija Sormunen & Taina Pihlajaniemi. The shed ectodomain of type XIII collagen associates with the fibrillar fibronectin matrix and may interfere with its assembly *in vitro*. ***Biochem Jour*** 393: 43-50, 2006.
10. Jeanne C. Myers, Peter S. Amenta, Arnold S. Dion, Justin P. Sciancalepore, Chandrasekaran Nagaswami, John W. Weisel and Peter D. Yurchenco. The molecular structure of human tissue type XV presents a unique conformation among the collagens. ***Biochem J*** 404: 535-544, 2007.
11. Jeanne C. Myers, Deqin Li, Peter S. Amenta, Charles C. Clark, Chandrasekaran Nagaswami, and John W. Weisel. Type XIX Collagen Purified from Human Umbilical Cord Is Characterized by Multiple Sharp Kinks Delineating Collagenous Subdomains and by Intermolecular Aggregates via Globular, Disulfide-linked, and Heparin-binding Amino Termini. ***J Biol Chem*** 278: 32047-32057, 2003.

12. Manuel Koch, Jessica E. Foley, Rita Hahn, Peihong Zhou, Robert E. Burgeson, Donald R. Gerecke, and Marion K. Gordon. α 1(XX) Collagen, a New Member of the Collagen Subfamily, Fibril-associated Collagens with Interrupted Triple Helices. *J Biol Chem* 276: 23120-23126, 2001.
13. D. Tuckwell. Identification and analysis of collagen α -1 (XXI), a novel member of the FACIT collagen family. *Matrix Bio* 21: 63-66, 2002.
14. Manuel Koch, Joerg Schulze, Uwe Hansen, Todd Ashwodt, Douglas R. Keene, William J. Brunken, Robert E. Burgeson, Peter Bruckner, and Leena Bruckner-Tuderman. A Novel Marker of Tissue Junctions, Collagen XXII. *J Biol Chem* 279: 22514-22521, 2004.
15. Jacqueline Banyard, Lere Bao, and Bruce R. Zetter. Type XXIII Collagen, a New Transmembrane Collagen Identified in Metastatic Tumor Cells. *J Biol Chem* 278: 20989- 20994, 2003.
16. Manuel Koch, Friedrich Laub, Peihong Zhou, Rita A. Hahn, Shizuko Tanaka, Robert E. Burgeson, Donald R. Gerecke, Francesco Ramirez, and Marion K. Gordon. Collagen XXIV, a Vertebrate Fibrillar Collagen with Structural Features of Invertebrate Collagens. *J Biol Chem* 278: 43236- 43244, 2003.
17. Tadafumi Hashimoto, Tomoko Wakabayashi, Atsushi Watanabe, Hisatomo Kowa, Ritsuko Hosoda, Atsushi Nakamura, Ichiro Kanasawa, Takao Arai, Koji Takio, David Mann and Takeshi Iwatsubo. CLAC A novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor CLAC-P/ collagen type XXV. *The EMBO J* 21: 1524-1534, 2002.
18. Keiji Sato, Kentaro Yomogida, Takayuki Wada, Tetuya Yorihuzi, Yoshitake Nishimune, Nobuko Hosokawa, and Kazuhiro Nagata. Type XXVI Collagen, a New Member of the Collagen Family Is, Specifically Expressed in the Testis and Ovary. *J Biol Chem* 227: 37678–37684, 2002.
19. Raymond P. Boot-Handford, Danny S. Tuckwell, Darren A. Plumb, Claire Farrington Rock and Richard Poulsom. A Novel and Highly Conserved Collagen (pro α 1(XXVII)) with a Unique Expression Pattern and Unusual Molecular Characteristics Establishes a New Clade within the Vertebrate Fibrillar Collagen Family. *J Biol Chem* 278: 31067-31077, 2003.
20. Guido Veit, Birgit Kobbe, Douglas R. Keene, Mats Paulsson, Manuel Koch and Raimund Wagener. Collagen XXVIII, a Novel von Willebrand Factor A Domain-containing Protein with Many Imperfections in the Collagenous Domain. *J Biol Chem* 281: 3494–3504, 2006.

21. Cilla Soderhal Ingo Marenholz, Tamara Kerscher, Franz Ru"schendorf, Jorge Esparza-Gordillo, Margitta Worm, Christoph Gruber, Gabriele Mayr, Mario Albrecht, Klaus Rohde, Herbert Schulz, Ulrich Wahn Norbert Hubner, Young-Ae Lee. Variants in a Novel Epidermal Collagen Gene (COL29A1) Are Associated with Atopic Dermatitis. *PLoS Bio* 5: 1952-1961, 2007.
22. Fred T Bosman and Ivan Stamenkovic. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200: 423-428, 2003.
23. Keith Brew, Deendayal Dinakarpanian, Hideaki Nagase. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Bioch et Bioph* 1477: 267-283, 2000.
24. Robert Visse and Hideaki Nagase. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *J Am Heart Asso* 92: 827-839, 2003.
25. Klaus Maskos. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochem* 87: 249-263, 2005.
26. Annie Pardo and Moises Selman. Matrix Metalloproteases in Aberrant Fibrotic Tissue Remodeling. *Proced Am Thorax Soc* 3: 383-388, 2006.
27. William G. Stetler-Stevenson. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases In Cell Signaling: Metalloproteinase-independent Biological Activities. *Inst Nat Health*: 1-19, 2008.
28. Alberto M. Penda's, Alicia R. Folgueras, Elena Llano, John Caterina, Franc,oise Frerard, Francisco Rodríguez, Aurora Astudillo, Agne`s Noel, Henning Birkedal-Hansen, and Carlos López-Otín. Diet-Induced Obesity and Reduced Skin Cancer Susceptibility in Matrix Metalloproteinase 19-Deficient Mice. *Mol and Cell Biol* 24: 5304-5313, 2004.
29. Misung Jo and Thomas E. Curry, Jr. Regulation of Matrix Metalloproteinase-19 Messenger RNA Expression in the Rat Ovary. *Biol Reprod*: 1796–1806, 2004.
30. Cornelia Kolb, Simon Mauch, Hans- Hartmut peter, Ulrich Krawinkel and Radislav Sedlacek. The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid patient. *Immuno Letters* 57: 83-88, 1997.
31. John J. Caterina, Joanne Shi, Christine A. Kozak, Jeffrey A. Engler and Henning Birkedal- Hansen. Characterization, expression analysis and chromosomal mapping of mouse Matrix Metalloproteinase-19 (MMP-19). *Mol Biol Reprod* 27: 73–79, 2000.

32. Cornelia Kolb, Simon Mauch, Ulrich Krawinkel, and Radislav Sedlacek. Matrix Metalloproteinase-19 in Capillary Endothelial Cells: Expression in Acutely, but Not in Chronically, Inflamed Synovium. *Exp Cell Res* 250: 122–130, 1999.
33. Ulla Impola, Mervi Toriseva, Sari Suomela, Leila Jeskanen, Niina Hieta, Tiina Jahkola, Reidar Grenman, Veli-Matti Kahari and Ulpu Saarialho-Kere. Matrix Metalloproteinase-19 is Expressed by Proliferating Epithelium but Disappears with Neoplastic Dedifferentiation. *Inst J Cancer* 103: 709–716, 2003.
34. Alberto M. Pendas, Vera Knaupers, Xose S. Puente, Elena Llano, Marie-Genevieve Mattei, Suneel Apte, Gillian Murphys, and Carlos López-Otín. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J Biol Chem* 272, 4281–4286, 1997.
35. Jelena Stojic, Carsten Hagemann, Stefanie Haas, Christian Herbold, Siglinde Kuhnel, Stefanie Gergras, Wolfgang Roggendorf, Klaus Roosen, Giles Hamilton Vince. Expression of matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-11 and MMP-19 is correlated with the WHO-grading of human malignant gliomas. *Neurosci Res* 60, 40–49, 2008.
36. HE Gruber, JA Ingram, EN Hanley Jr. Immunolocalization of MMP-19 in the human intervertebral disc: implications for disc aging and degeneration. *Biotech Histochem* 80, 157- 162, 2005.
37. Cornelia Mauch. Matrix Metalloproteinase-19: What Role Does this Enzyme Play in Wound Healing?. *J Invest Dermatol*: xix-xx, 2003.
38. Simon Mauch, Cornelia Kolb, Birgit Kolb, Thorsten Sadowski, and Radislav Sedlacek. Matrix Metalloproteinase-19 Is Expressed in Myeloid Cells in an Adhesion-Dependent Manner and Associates with the Cell Surface. *J Immunol* 168: 1244–1251, 2002.
39. Inken M. Beck, Rene Ruckert, Katja Brandt, Markus S. Mueller, Thorsten Sadowski, Rena Brauer, Peter Schirmacher, Rolf Mentlein, Radislav Sedlacek. MMP19 Is Essential for T Cell Development and T Cell-Mediated Cutaneous Immune Responses. *PLoS ONE* 3: 1-11, 2008.
40. Justyna Mysliwy, Andrew J. Dingley, Radislav Sedlacek, Joachim Grötzinger. Structural characterization and binding properties of the hemopexin-like domain of the matrix metalloproteinase-19. *Prot Express Purif* 46: 406–413, 2006.

41. Niina Hieta, Ulla Impola, Carlos López-Otín, Ulpu Saarialho-Kere, and Veli-Matti Kahariaw. Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Dermal Wounds and by Fibroblasts in Culture. *J Inves Derma* 121:997-1004, 2003.
42. Jan O. Stracke, Amanda J. Fosang, Karena Lastb, Francesca A. Mercurib, Alberto M. Pendas, Elena Llano, Roberto Perrisd, Paul E. Di Cesare , Gillian Murphya, Vera Knauper. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Letters* 478: 52-56, 2000.
43. Jan O. Stracke, Mike Hutton, Margaret Stewart, Alberto M. Pendas, Bryan Smithi, Carlos López-Otin, Gillian Murphy, and Vera Knauper. Biochemical Characterization of the Catalytic Domain of Human Matrix Metalloproteinase 19: Evidence for a Role as a Potent Basement Membrane Degrading Enzyme. *J Biol Chem* 275: 14809-14816, 2000.
44. B.Titz, S. Dietricha, T. Sadowskia, C. Becka, Petersenb and R. Sedlaceka. Activity of MMP-19 inhibits capillary-like formation due to processing of nidogen-1. *Cell Mol Life Sci* 61: 1826–1833, 2004.
45. T. Sadowskia, S. Dietricha, F. Koschinskya, A. Ludwiga, E. Prokschb, B.Titza and R. Sedlaceka. Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration. *Cell Mol Life Sci* 62: 870–880, 2005.
46. Inken M. Beck, Matthias Muller, Rolf Mentlein, Thorsten Sadowski, Markus S. Mueller, Ralf Paus and Radislav Sedlacek. Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Keratinocytes Is Repressed by Transcription Factors Tst-1 and Skn-1a: Implications for Keratinocyte Differentiation. *J Inves Derma* 127: 1107–1114, 2007.