

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PARTICIPACIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS EN LA EXPRESIÓN
DE IL-10 POR LEUCOCITOS DE HUMANO EXPUESTOS A
COLÁGENAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ALEXIS PAULINA JIMÉNEZ URIBE

Asesores:

MD, PhD Lourdes Andrea Arriaga Pizano

MVZ, PhD María de Lourdes Juárez Mosqueda

México, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MVZ Francisco Javier Basurto Alcántara

VOCAL: MVZ Mario Pérez Martínez

SECRETARIO: MVZ Jorge Hernández Espinosa

SUPLENTE: MVZ María de Lourdes Juárez Mosqueda

SUPLENTE: MVZ Laura Cobos Marín

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

ASESOR EXTERNO: MD, PhD Lourdes Andrea Arriaga Pizano

ASESOR INTERNO: MVZ, PhD María de Lourdes Juárez Mosqueda

SUSTENTANTE: Alexis Paulina Jiménez Uribe

DEDICATORIAS:

A todas aquellas personas que me han apoyado en mi desarrollo tanto personal como académico.

A mi familia: Aurora, Francisco y Lídice.

A quienes son como mi familia: Ángel, Carmen, Lila y Ángel grande.

A la Dra. Lulú por su apoyo, cariño e innumerables enseñanzas.

Al Dr. Armando Isibasi y al Dr. Constantino López por todo su apoyo.

A mis compañeros y amigos de la UIMIQ.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Armando Isibasi por permitirme ser parte del grupo de la Unidad de Investigación Médica en Inmunquímica, así como por todo el apoyo y enseñanzas que me ha brindado.

Al Dr. Constantino López por el gran apoyo académico y por ser mi mejor ejemplo de perseverancia.

Al M. en C. Ismael Mancilla Herrera por todas las enseñanzas, asesoría técnica, paciencia y amistad que me ha brindado.

A la M. en C. Jacqueline L. Oliva Ramírez por toda la ayuda y amistad que me ha brindado.

Al M. en C. Javier Arturo Sánchez López por ser mi maestro y amigo.

Al Dr. Pedro Cortés del CINVESTAV por toda la asesoría técnica.

A la Dra. Ma. de Lourdes Juárez Mosqueda por su asesoría.

A todos mis compañeros y amigos de la UIMIQ: Esteban, Emiliano, Pablo Vierya, Pablo Núriban, Marisol, Adriana, Raúl, Marcela, Mireille, Gabriela, Ilka, Liz, Juan, Mario, Francisco, Daniel, Rafael, Evelyn, Sofía, y espero no haber olvidado a alguien.

A Ángel por apoyarme durante tanto tiempo, crecer y aprender juntos, y por creer en mí.

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, Elihú Aranday y Uziel Castillo por haberme iniciado en el maravilloso camino de la ciencia.

Y de manera muy especial a la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano por todo su apoyo, enseñanzas, cariño, y por ser mi ejemplo a seguir.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS	1
ABREVIATURAS.....	2
RESUMEN	3
ANTECEDENTES	5
EL PROCESO INFLAMATORIO	5
CÉLULAS INFLAMATORIAS E INFILTRACIÓN TISULAR.....	6
METALOPROTEINASAS DE MATRIZ	12
METALOPROTEINASAS Y RESPUESTA INMUNE INNATA	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	21
Objetivos particulares	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
Recubrimiento de placas con colágena tipo I y colágena tipo IV.	22
Separación de las células mononucleares de sangre periférica por diferencia de gradiente	22
Cuantificación de citocinas por el método de CBAs	26
Cuantificación de proteínas totales en sobrenadante por el método de ácido bicinconónico	26
Determinación de la actividad relativa de MMP por zimografía	26
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	41
PERSPECTIVAS.....	42
REFERENCIAS.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Esquema de los pasos iniciales la migración de leucocitos circulantes hacia los tejidos periféricos.	8
Figura 2. Principales dominios estructurales de las metaloproteinasas de matriz.	14
Figura 3. Activación de las metaloproteinasas de matriz por el mecanismo de switch de cisteína.	17
Figura 4. Separación de CMSPs por la técnica de diferencia de gradiente.	23
Figura 5. Colágena IV induce la expresión de MMP-9 en CMSP.	29
Figura 6. Capacidad de la inhibición del A. BSAFP sobre la actividad de MMP-9.	30
Figura 7. Efecto de la MMP-9 sobre la producción de IL-10, TNF- α e IL-1 β .	33-34
Figura 8. A. BSAFP no induce cambios en IL-10 producida por linfocitos y monocitos.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y distribución de los diferentes tipos de colágenas.	10
Tabla 2. Producción de IL-10, TNF- α e IL-1 β por CMSP estimuladas con LPS, expuestas o no a colágenas, y en ausencia o presencia de A. BSAFP.	32

ABREVIATURAS

A BSAFP	Ácido bifenil sulfonil amino fenil propiónico
BCA	Ácido bicinconínico
CBA _s	Arreglo citométrico en perlas
CMS _P	Células mononucleares de sangre periférica
DAMP _s	Patrones moleculares asociados a daño
EDTA	Ácido etil diamino tetra acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FACIT	Colágenas asociadas a fibrillas con interrupciones en la triple hélice
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fn	Fibronectina
Gly	Glicina
Gly Cam1	Molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación tipo I
I-CAM	Moléculas de adhesión Intercelular
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolisacárido
MCSF	Factor estimulante de crecimiento de colonias de macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MEC	Matriz extracelular
MMP _s	Metaloproteinasas de matriz
PAMP _s	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PE	Ficoeritrina
PECAM	Molécula de adhesión celular endotelial/plaquetaria
PE Cy7	Ficoeritrina cianina 7
RANTES	Citocina secretada por linfocitos T normales y regulada por activación
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
SRLP	Proteoglicanos pequeños ricos en leucina
STAT5	Proteínas de señal activación de transcripción y transducción
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta
TIMP _s	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

JIMÉNEZ URIBE ALEXIS PAULINA

PARTICIPACIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS EN LA EXPRESIÓN DE IL-10 POR LEUCOCITOS DE HUMANO EXPUESTOS A COLÁGENAS

En los procesos inflamatorios localizados, los leucocitos suelen ser reclutados desde la circulación a los tejidos lesionados. Durante esta migración los leucocitos entran en contacto con componentes de la matriz extracelular (MEC), de los cuales, las colágenas son un componente mayoritario. Se sabe que el reconocimiento los componentes de la MEC y la presencia de citocinas pro-inflamatorias, inducen en los leucocitos la expresión de moléculas de superficie y solubles que facilitan su infiltración, siendo las más estudiadas las moléculas de adhesión y las metaloproteinasas de matriz (MMPs), que al remodelar la MEC crean los espacios necesarios para la migración celular. Adicionalmente, existen algunas evidencias de que la actividad de diferentes MMPs influye en la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria, ya sea mediante los cambios proteolíticos sobre citocinas, como la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF- α), así como en la generación de fragmentos protéicos que se reconozcan por receptores para patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Se ha propuesto que la activación derivada de este reconocimiento de los fragmentos de la MEC puede favorecer la presencia de procesos inflamatorios crónicos, como los de artritis y psoriasis. Recientemente se ha observado que la exposición a colágena de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) puede disminuir su capacidad de producción de TNF- α y aumentar la de IL-10 en presencia de estímulos inflamatorios como el

lipopolisacárido (LPS). No existe evidencia de si ésta acción se deriva del reconocimiento de las colágenas íntegras o de si se requiere que éstas se encuentren fragmentadas. Se sabe que el contacto de leucocitos con proteínas de la MEC induce la expresión de las formas activas de MMPs, por lo que en el presente trabajo se decidió explorar si la actividad de la MMP-9 se relaciona con la capacidad de secreción de diferentes citocinas, como la anti-inflamatoria IL-10, además de TNF- α e IL-1 β . Después de exponer en un modelo *in vitro* CMSP de sujetos sanos aisladas mediante un gradiente de densidad, observamos que si bien la colágena no induce la producción de ninguna de las citocinas por sí sola, las CMSPs previamente expuestas a colágena tipo IV, al ser estimuladas con LPS producen una mayor cantidad de IL-10 que sin la exposición previa. Esta secreción de IL-10, lo mismo que la de TNF α e IL-1 β , se abate en presencia del inhibidor de MMP- 9, A.BSAFP, lo que sugiere que la secreción de estas citocinas por CMSP activadas con LPS depende de la actividad de ésta MMP-9.

ANTECEDENTES

EL PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación representa un mecanismo fisiológico de respuesta ante un estímulo de daño, como infecciones, lesiones o traumas; donde se desarrolla un microambiente caracterizado por la presencia de citocinas, quimiocinas, histamina y otras moléculas necesarias para activar y reclutar células inflamatorias que se acumularán en el sitio lesionado^{1,2,3}. Los neutrófilos son las primeras células en migrar del torrente sanguíneo al sitio de lesión; éste proceso está bajo regulación de citocinas y quimiocinas como la IL-8 y RANTES, que pueden ser producidas en los tejidos por las células residentes de estirpe inmunológica, endotelial o epitelial.

Conforme la inflamación progresa, otros tipos de leucocitos, como los monocitos y los linfocitos, también son activados. Éstos son atraídos al sitio de inflamación por otra serie de citocinas y quimiocinas, como MCP-1 y algunos factores de crecimiento^{4,5}. Conforme se perpetúa el proceso inflamatorio se pueden sumar al infiltrado células dendríticas y células plasmáticas⁶.

Para salir del torrente sanguíneo y llegar al sitio de daño, las células tienen que atravesar las paredes vasculares y luego migrar a través de la MEC, hasta llegar al sitio de lesión y realizar funciones tales como fagocitosis, estallido respiratorio o liberación de sustancias antimicrobianas y citocinas. Idealmente, estas funciones deben destruir o controlar a los agentes infecciosos que desencadenaron la respuesta inicial, sin embargo, la presencia de las células inflamatorias que liberan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, puede generar un daño continuo al tejido. Así, en vez de que se restablezca la homeostasis del tejido y se recupere la función del mismo, se puede perder la continuidad morfológica y la función del tejido, dando lugar a procesos de inflamación crónica y/o fibrosis^{2,7,8}.

Es entonces evidente que se requiere de mecanismos de regulación de la respuesta inflamatoria que eviten el daño tisular, cicatrización anormal o fibrosis. Estos mecanismos incluyen el bloqueo del tránsito de células hacia el sitio de lesión, la depuración de células apoptóticas y otros potenciales DAMPs, la disminución en la liberación de citocinas inflamatorias y la liberación de moléculas anti-inflamatorias, como lipoxinas, resolvinas e IL-10⁹. Ésta última, IL-10, es un potente inmunoregulador que pueden producir linfocitos, monocitos y células epiteliales; es capaz de inhibir la producción de citocinas como IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-18, IL-6 e IL-12, capaces de perpetuar la respuesta inflamatoria; así como también ciertas quimiocinas como MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 y MIP-2. Además, se sabe que ésta citocina en presencia de IL-12, puede prevenir la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 durante los procesos fibróticos¹⁰.

CÉLULAS INFLAMATORIAS E INFILTRACIÓN TISULAR

Como se mencionó, la migración celular es crucial durante la respuesta inflamatoria y está involucrada en otros procesos como el desarrollo embrionario, neurogénesis, vasculogénesis e incluso en la formación de tumores y metástasis. Durante la migración, la célula modifica su morfología, lo que involucra cambios de membrana plasmática y citoesqueleto. Así, por ejemplo, los filamentos de actina se polarizan hacia los complejos adhesivos de membrana. Es importante recordar que estas adhesiones focales deben de ser dinámicas, a fin de permitir el anclaje y liberación de las células conforme avanzan a través de los tejidos que infiltran. El proceso de infiltración requiere de cuatro pasos iniciales, que son: 1) el rodamiento (para disminuir la velocidad de las células); 2) la adhesión débil (hacia el endotelio); 3) la adhesión fuerte y activación; 4) la diapédesis o extravasación (Figura 1).

Diferentes moléculas de superficie son requeridas para poder llevar a cabo los diferentes pasos descritos. El rodamiento se inicia por interacciones transitorias entre moléculas como el

ácido siálico presente en la superficie del leucocito con la E-selectina del endotelio. La adhesión débil depende de interacciones entre moléculas como CD11 del leucocito con moléculas de adhesión del endotelio tales como I-CAM. La adhesión fuerte incluye la unión de L-selectinas del leucocito a sus ligando en la superficie del endotelio, como son las glicoproteínas tipo Gly-Cam1. Durante estos procesos también se favorece, la expresión de receptores a quimiocinas que facilitan la capacidad de activación de los leucocitos. En la diapédesis, los linfocitos se polarizan de manera dependiente de actina y transitan lateralmente (de manera dependiente de integrinas) en la superficie luminal del endotelio. El reconocimiento por los leucocitos de CD31 expresada por las células endoteliales, favorece la expansión de los espacios interendoteliales, con la consecuente salida de leucocitos del vaso sanguíneo y su encuentro con la membrana basal. Esta membrana constituye el primer punto de contacto con la MEC y continuará conforme la célula migre hacia las diferentes estructuras o estratos del tejido que infiltra^{11, 12}.

La membrana basal es un tipo de MEC especializada con la que primeramente entran en contacto los leucocitos infiltrantes de tejido^{13, 14}. Ante el reconocimiento de la MEC, se adhieren fuertemente a ésta a través de receptores tipo integrinas. Al ocurrir ésta unión, se envían señales dentro de la célula para la expresión, entre otros genes, de proteasas del tipo MMPs que pueden degradar componentes de la MEC y con esto facilitar la migración celular hasta el sitio de daño^{13, 15}.

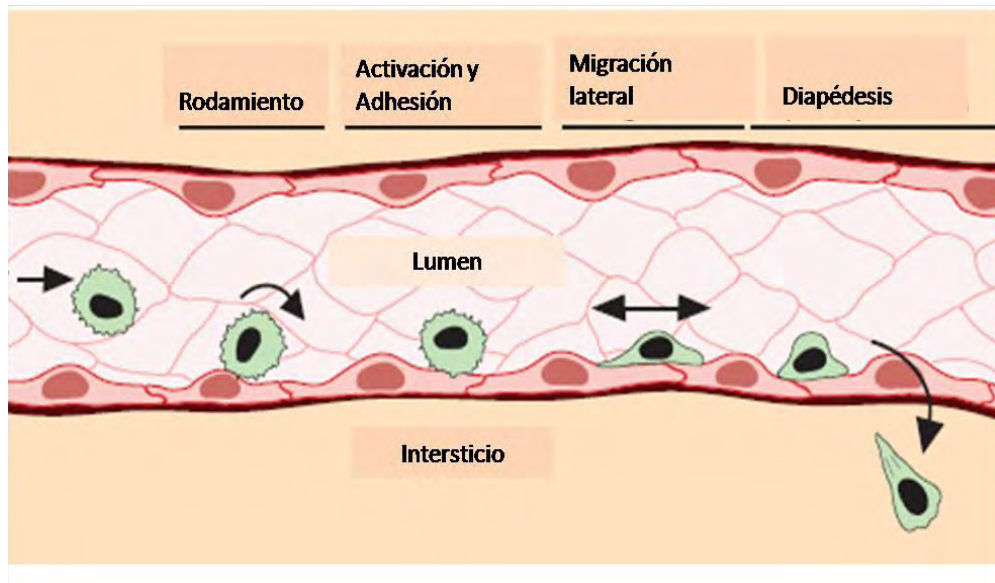


Figura 1. Esquema de los pasos iniciales la migración de leucocitos circulantes hacia los tejidos periféricos. En el esquema se muestran los diferentes pasos requeridos para que los leucocitos circulantes rueden, se adhieran y finalmente atraviesen el endotelio vascular hacia los tejidos. Modificado de Carman VC, Journal of Cell Science 2009;122: 3025-3035.

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La MEC, se ha descrito como una estructura que brinda soporte, fuerza, arquitectura y comunicación a los tejidos y órganos¹⁶. Ya que la información del medio se puede transferir a través de ella a las células de los tejidos¹⁷, la MEC es indispensable para los organismos multicelulares¹⁶. Ultraestructuralmente está constituida por dos compartimentos principales o unidades de organización: 1) la membrana basal y 2) la matriz intersticial. Ambos comparten una estructura básica formada por andamios de colágenas, sin embargo, dependiendo del tipo de colágena que presentan, difiere la arquitectura tridimensional. Así, dependiendo del tejido, será el tipo de colágenas que participan en la formación de la MEC.

Los componentes de la MEC se clasifican en componentes fibrosos y no fibrosos, perteneciendo a los primeros proteínas del tipo colágenas, elastinas y resilinas; mientras que los componentes no fibrosos, corresponden a proteoglicanos y glicoproteínas del tipo

laminina, fibronectina y entactina. Entre los componentes fibrosos, como se mencionó, están las colágenas, que son los componentes protéicos más abundantes de la MEC (80%). Las colágenas, son proteínas homo o hetero triméricas formadas por cadenas alfa, que tienen como función mantener la integridad estructural de tejidos y órganos. La secuencia de aminoácidos de las cadenas alfa contiene un número variable de los motivos repetitivos clásicos Gly-X-Y, donde frecuentemente X es prolina o lisina y Y hidroxiprolina o hidroxilisina. Actualmente, en vertebrados, se han identificado más de 28 diferentes tipos de colágenas, sintetizadas por una gran variedad de tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos, células epiteliales o células endoteliales^{19, 20, 21}.

Las colágenas se clasifican según su función y homología en: 1) formadoras de fibrillas, 2) asociadas a fibrillas con interrupciones en la triple hélice (FACITs), 3) formadoras de redes, 4) transmembranales, 5) productoras de endostatina, 6) fibras de anclaje y 7) formadoras de filamentos de perlas. Éstas se distribuyen en todo el organismo y diferencialmente según el tejido en que se encuentren. (Tabla 1)

TIPO DE COLÁGENA	CLASIFICACIÓN	DISTRIBUCIÓN
I	Formadora de fibrillas	Piel, tendones, ligamentos, córnea, huesos
II	Formadora de fibrillas	Cartílago, humor vítreo
III	Formadora de fibrillas	Órganos tubulares, piel embrionaria, codistribuida con colágena tipo I
IV	Formadora de redes	Membrana Basal
V	Formadora de fibrillas	Tejido embrionario, córnea, codistribuida con colágena tipo I.
VI	Formadora de filamentos de perlas	Músculo
VII	Fibras de anclae	Uniones dermis-epidermis
VIII	Formadora de redes	Membrana Descement
IX	FACIT	Cartílago, humor vítreo, codistribuida con colágena tipo I
X	Formadora de redes	Cartílago hipertrofiado
XI	Formadora de fibrillas	Codistribuida con colágena tipo II
XII	FACIT	Encontrada con colágena tipo I
XIII	Transmembranal	Ojo, músculo, vasos sanguíneos
XIV	FACIT	Encontrada con colágena tipo I
XV	Productora de Endostatina	Ojo, músculo, vasos sanguíneos. Cerca de membrana basal
XVI	FACIT	Codistribuida con colágenas formadoras de fibrillas
XVII	Transmembranal	Epitelio
XVIII	Productora de endostatina	Asociada a membrana basal
XIX	FACIT	Membrana basal.
XX	FACIT	Mayoría de los tejidos
XXI	FACIT	Mayoría de los tejidos
XXII	FACIT	Uniones tisulares
XXIII	Transmembranal	Rara
XXIV	Formadora de fibrillas	Hueso
XXV	Transmembranal	Patológica
XXVI	Formadora de filamentos de perlas	Desconocido
XXVII	Formadora de fibrillas	Tejido embrionario
XXVIII	Formadora de filamentos de perlas	Membrana basal de tejido nervioso
Ectodisplisina A	Tranmembranal	Ectodermo
Gliomedina	Tranmembranal	Tejido nervioso

Tabla 1. Clasificación y distribución de los diferentes tipos de colágenas. Tomado de Kadler EK, Baldock C, Bella J, Boot-Handford PR. Journal of cell science 2007; 120: 1955-1958

Otros componentes protéicos fibrosos de la MEC son la elastina y la fibrilina, proteínas ubicuas del tejido conectivo que forman las llamadas fibras elásticas, donde la elastina

corresponde al material amorfo y las fibrilinas, junto con otras proteínas pequeñas constituyen las microfibras^{20, 21, 22}.

Los componentes no fibrosos, proteoglicanos, están formados por cadenas laterales de glicosaminoglicanos unidas a un centro protéico. Estos componentes se pueden agrupar en varias familias: la primera corresponde a los lecticanos, como el agrecano, versicano, neurocano y brevicano, que pueden estimular la proliferación de fibroblastos y condrocitos. La segunda familia son los proteoglicanos ricos en leucina o también llamados SRLPs, que pueden organizar las redes de colágena y algunos de ellos regular la transducción de señales a través del factor de crecimiento epidérmico (EGF), ejemplos de este grupo son la decorina y fibromodulina. La tercer familia es de proteoglicanos que contienen heparán sulfato, e incluye al perlecano, la agrinina, los sindecanos y los glipicanos; éstos se encuentran asociados a membranas basales, además de su función estructural tienen efectos sobre gran variedad de funciones celulares. Algunos estudios demuestran que moléculas como CD44, una glicoproteína transmembranal implicada en la adhesión celular; el factor estimulador de colonias de monocitos (MCSF), proteínas precursoras de amiloide y varias colágenas (IX, XII, XIV, XVIII) son proteoglicanos de “medio tiempo”, ya que pueden o no estar asociados a cadenas de glicosaminoglicanos^{21, 22}. Otro grupo de proteínas que componen la MEC son las glicoproteínas, éstas generalmente funcionan como moléculas de adhesión, entre células, entre células y MEC, así como entre moléculas de la MEC y entre sí. La fibronectina, tenascina, matrilinas, tromboespoindinas, lamininas y nidógeno o entactina, son algunas de las glicoproteínas más conocidas^{23, 24}.

La estructura que se forma por la interacción de proteoglicanos, proteínas y glicoproteínas de la MEC permite el desarrollo tisular, el transporte y absorción de nutrientes, así como la proliferación y migración celular. Se sabe que las moléculas de la MEC son multifuncionales, ya que frecuentemente comparten dominios repetidos entre ellas, por lo que se les llaman

moléculas quiméricas. Algunas funciones incluyen el reconocimiento por integrinas, predisposición a la oligomerización, reconocimiento por metaloproteinasas de matriz (MMPs), la habilidad de formar diversas interacciones intramatriz, entre otras²⁰. Para cumplir con todas éstas funciones, la MEC requiere ser una estructura altamente dinámica con remodelaciones continuas que dependen en buena medida de la actividad de proteasas, como las MMPs y las serin-proteasas²².

METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) o matrixinas, son proteinasas dependientes de zinc y calcio, secretadas o ancladas a la superficie celular, que participan en la degradación o procesamiento de numerosos sustratos pericelulares que son parte de la MEC. Así las MMPs son capaces de regular varios procesos biológicos²⁵. Actualmente se sabe que, además de digerir a las proteínas de la MEC, procesan muchos componentes de la superficie celular que pueden ser reguladores solubles de las funciones celulares. Entre estas moléculas reguladoras que dependen de MMPs para su activación, están varias citocinas que requieren ser liberadas directamente de la membrana plasmática por acción enzimática²⁴. Se han identificado 24 diferentes MMPs en vertebrados, de las cuáles 23 se han encontrado en humanos. Todas las MMPs son sintetizadas como proenzimas y generalmente son secretadas como pro-MMPs inactivas y luego activadas por catálisis; algunas, sin embargo, pueden quedar ancladas en la membrana, activarse y desde allí ejercer su actividad de proteasas. Los sustratos suelen ser compartidos entre las diferentes MMPs e incluyen a los componentes de la MEC, citocinas, enzimas y factores de crecimiento, entre otros²⁶.

Las diferentes MMPs presentan varios dominios comunes: un prodominio amino terminal, un dominio catalítico, un dominio parecido a la hemopexina carboxilo terminal y una región bisagra que une al dominio parecido a la hemopexina con el dominio catalítico (Figura 2). En

el prodominio aminoterminal existe una secuencia conservada donde se encuentra la cisteína que une al zinc del dominio catalítico. El dominio catalítico contiene el motivo de unión al zinc, que junto con los iones zinc y calcio (2 o 3) permanentemente unidos a los residuos proteicos estabilizan la actividad enzimática. En éste mismo dominio, las MMPs -2 y -9, tienen insertadas 3 repeticiones del dominio tipo II de fibronectina (FnII), involucrado en la unión al sustrato. El dominio carboxilo terminal parecido a la hemopexina es importante en la activación o inhibición de la enzima^{27, 28}.

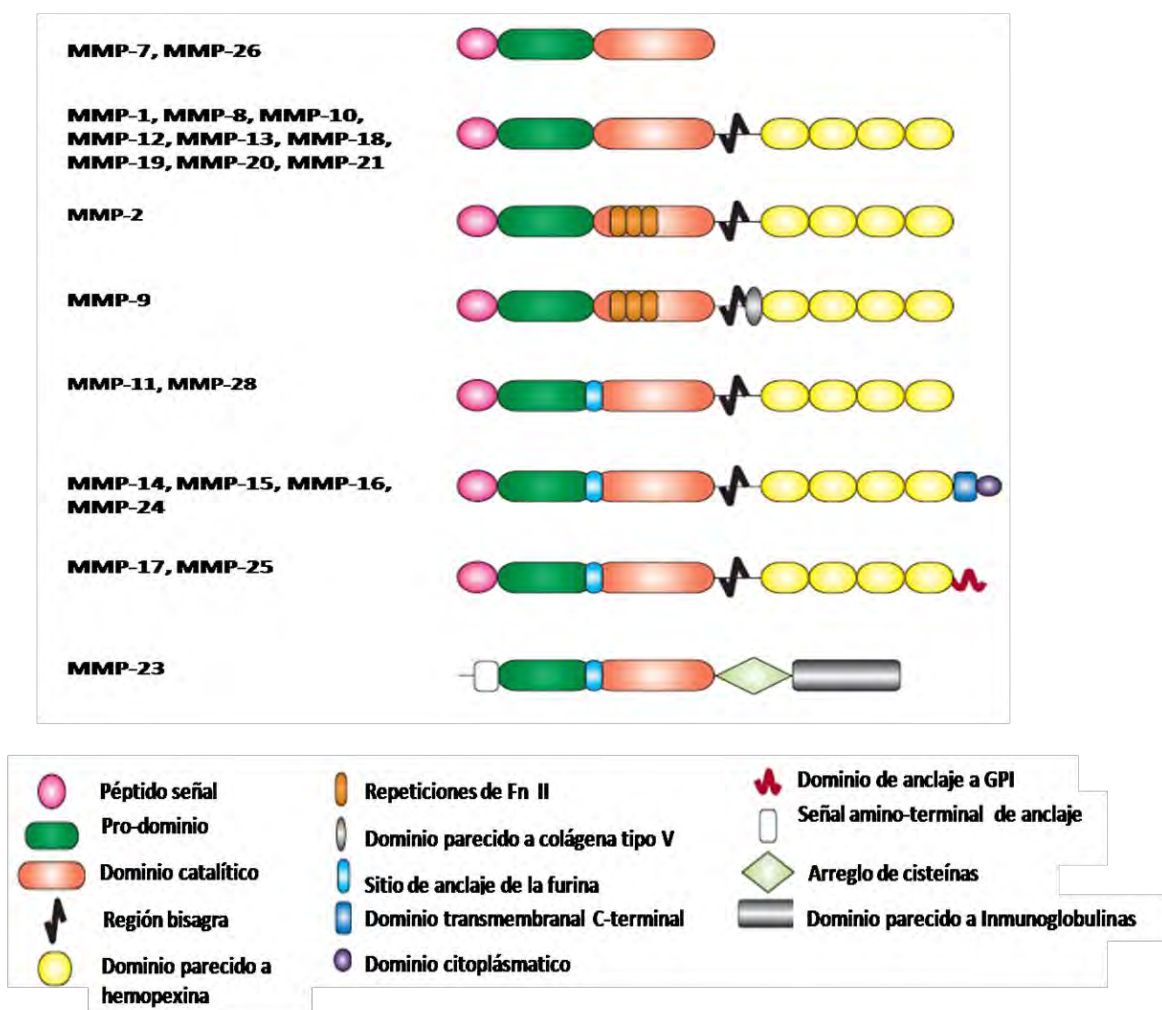


Figura 2. Principales dominios estructurales de las metaloproteinasas de matriz. Tomado y modificado de Somerville PTR, Oblander AS, Apte SS. *Genome Biology* 2003; 4:1-11.

Los diferentes tipos de metaloproteinasas se clasifican de acuerdo a su estructura y función en:

1) **Colagenasas:** se anclan a colágenas intersticiales (colágenas I, II y III) en sitios específicos y pueden tener otros sustratos no pertenecientes a la MEC. Este grupo incluye a MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18.

2) **Gelatinasas:** Son enzimas que digieren colágena desnaturalizada y gelatinas y sus miembros son la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9). De manera característica tienen 3 repeticiones de un dominio de fibronectina tipo II insertadas en el dominio catalítico que se une al sustrato (gelatina, colágenas o laminina). La MMP-2 digiere colágenas tipo I, II y III, mientras que la MMP-9 digiere la colágena tipo IV de manera específica.

3) **Estromelisin:** Incluyen a las estromelisina I (MMP-3) y a la estromelisina 2 (MMP-10), los sustratos de ambas son similares e incluyen a proteoglicanos, lamininas, colágenas, pro-MMPs. Además de la digestión de los componentes de la MEC, la MMP-3 activa a otras pro-MMPs y su acción es crítica para la activación de MMP-1. MMP-3 tiene mayor eficiencia proteolítica que la MMP-10.

4) **Matrilisin:** Se caracterizan por no tener el dominio tipo hemopexina, en este grupo se encuentran la matrilisina 1 (MMP-7), la matrilisina 2 (MMP-26). Además de componentes de MEC, la MMP-7 procesa moléculas de superficie celular como la- pro-defensinas, Fas-ligando, pro TNF- α y E-cadherina.

5) **MMPs de membrana:** Incluyen a las MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MP-24, MMP-17 y MMP25, cuyos sustratos son las gelatinas, fibronectinas, colágenas, agrecanos e incluso componentes de la membrana celular.

Existen otras MMPs sin clasificación que incluyen a la MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23 y MMP-28.

Entre las funciones de las MMPs se incluyen la remodelación de la MEC, la liberación de fragmentos bioactivos y de nuevos epítomos de las moléculas de la MEC y la liberación de factores de crecimiento secuestrados dentro de la MEC (como VEGF o TGF- β). Las MMPs son capaces de modificar la interacción célula-MEC, lo cual es indispensable para la movilización celular fuera del tejido, como ocurre en la metástasis^{29, 30}.

Debido a su alto potencial para degradar y/o destruir los tejidos, las MMPs están fuertemente reguladas en varios niveles: transcripcional, a nivel de activación del zimógeno, a través de inhibidores extracelulares, por su localización y por disponibilidad o afinidad al sustrato. Además, intrínsecamente, el prodominio mantiene a la enzima latente por medio del grupo tiol de las cisteínas, las cuáles se encuentra altamente conservadas en el extremo carboxilo terminal de éste prodominio. Las cisteínas actúan como ligando para el átomo de zinc que se encuentra en el dominio catalítico, lo que resulta en la exclusión de agua y mantenimiento de la enzima inactiva²⁹. Para que la enzima se active, la unión de las cisteínas con el zinc debe ser interrumpida por un cambio conformacional o por proteólisis (por otra MMP o por plasmin proteasas). Una vez que el grupo tiol ha sido reemplazado por agua, la enzima es capaz de autoactivarse hidrolizando el propéptido para completar el proceso de activación y poderse unir a su sustrato. Éste mecanismo de regulación se ha llamado mecanismo “interruptor” de cisteína (Figura 3). Como se mencionó, muchas MMPs no están activas hasta que salen de la célula. Una vez activas, hay mecanismos de inactivación que entran en juego,

como son los inhibidores de metaloproteinasas en tejido (TIMPs)³⁰. De manera normal, en los tejidos sanos, las MMPs no están activas, pero en procesos infecciosos, inflamatorios, procesos de reparación y remodelación tisular, así como en cultivos *in vitro*, su actividad puede manifestarse en diferentes grados, por ejemplo, durante el proceso inflamatorio, los oxidantes generados por leucocitos y otras células pueden activar a las MMPs a través de oxidación del grupo tiol que promueve el estallido de su actividad proteolítica¹².

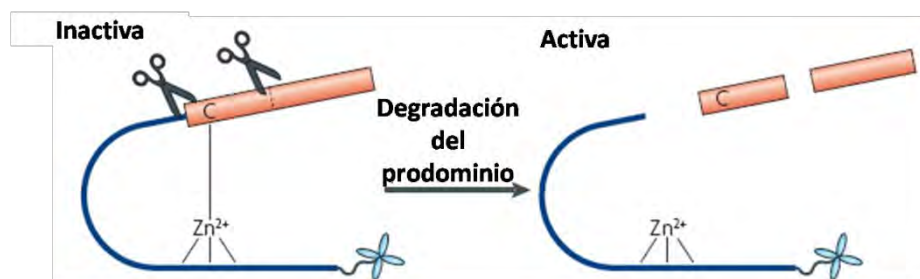


Figura 3. Activación de las metaloproteinasas de matriz por el mecanismo de switch de cisteína. En el esquema se muestra cómo al desacoplarse la unión entre el zinc del dominio catalítico y la cisteína del prodominio, al degradarse el prodominio es posible la activación de la metaloproteína. Tomado y modificado de Somerville PTR, Oblander AS, McCaw-Page A, Ewald JA, Werb Z. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2007; 8:221-233.

METALOPROTEINASAS Y RESPUESTA INMUNE INNATA

Los epitelios de revestimiento actúan como una barrera física, donde además se congregan muchos de los componentes tempranos de la inmunidad innata. El daño epitelial puede constituir un punto de entrada para microorganismos y toxinas. El epitelio dañado responde rápidamente, liberando mediadores solubles, citocinas y quimiocinas que fomentan la proliferación y migración celular hacia el sitio dañado. Es entonces evidente que la respuesta inflamatoria local induce la expresión y/o activación de varias MMPs, que ayudan a las células de estirpe inmunológica a migrar al sitio de daño, a remodelar el tejido dañado o bien,

in vitro, se ha observado que pueden activar a citocinas y quimiocinas. Así, MMP-2, -3 y -9 pueden degradar y activar al precursor de IL-1 β , mientras que MMP-1, -2, 3 y -9 pueden procesar el pro-TNF- α a su forma activa^{12, 31}. La actividad de las MMPs, además puede generar metabolitos que amplifiquen o antagonicen los efectos correspondientes a las quimiocinas, como es el caso de el procesamiento de IL-8 por la MMP-9, donde los fragmentos de IL-8 pueden incrementar la capacidad quimioatrayente de la quimiocina. Los fragmentos derivados de la degradación de la MEC eventualmente pueden actuar como DAMPs³² y contribuir en el proceso inflamatorio de diversas patologías, tales como, artritis, psoriasis y cáncer, entre otras^{2, 33, 34}. Se entiende entonces que la actividad desregulada de las MMPs, puede generar destrucción exacerbada de componentes de la matriz extracelular y participar en la patofisiología de éstas enfermedades.

En relación a esto último, recientemente, al comparar la respuesta de las células mononucleares (CMSP) obtenidas de sangre periférica expuestas a colágenas tipo I y IV de sujetos sanos con las (CMSP) de sujetos con psoriasis, observamos que la exposición a colágena tipo IV, pero no a colágena tipo I, indujo la producción de diferentes citocinas ante estímulos inflamatorios como el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* a una concentración de 1 μ g/mL. Además, las CMSP de ambos disminuyen su capacidad de producción de TNF- α ante LPS después de haber estado en contacto con colágena IV, mientras que incrementan la secreción de IL-10³⁵. Esta última es una citocina anti-inflamatoria, por lo que este resultado sugiere que el contacto con la colágena IV podría disminuir la capacidad inflamatoria de los leucocitos infiltrantes en los tejidos como una forma de control de la respuesta innata a nivel local^{35, 36}. Sin embargo, poco se conoce sobre si ésta respuesta está dada por el reconocimiento de las colágenas en su forma nativa o degradada y si este efecto guarda alguna relación con la actividad de las MMPs

JUSTIFICACIÓN

En diversas patologías humanas como artritis, psoriasis, aterosclerosis y lupus eritematoso sistémico, además del proceso inflamatorio local caracterizado por infiltración de leucocitos, existe remodelación de la MEC y activación de MMPs. Se ha propuesto que en estas enfermedades hay un componente proinflamatorio exacerbado, así como anti-inflamatorio disminuido. Para esclarecer esto, es necesario, primero, conocer cuál es el papel de la MEC y sus componentes, íntegros y degradados, en la modulación de la respuesta inflamatoria. El conocer éstos mecanismos podría llevar no sólo a la descripción fisiopatológica de estas enfermedades, sino también a reconocer posibles blancos terapéuticos que resuelvan o disminuyan los procesos inflamatorios asociados a remodelación de la MEC.

HIPÓTESIS

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de sujetos normales expuestas a colágena presentaran menor capacidad inflamatoria y el efecto será dependiente de la actividad de metaloproteinasa 9.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la acción de la metaloproteinasa 9 sobre las colágenas tipo IV y I, modifica la capacidad de secreción de la citocina IL-10, así como de TNF- α e IL-1 β por células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos en un modelo *in vitro*.

Objetivos particulares

- Determinar la actividad de metaloproteinasa 9 secretada por células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos expuestas a colágena IV y I en un modelo *in vitro*.
- Cuantificar la cantidad de IL-10, TNF- α e IL-1 β producida por células mononucleares de sangre periférica expuestas a colágenas tipo IV y I, en presencia y ausencia de un inhibidor de metaloproteinasas de matriz.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recubrimiento de placas con colágena tipo I y colágena tipo IV.

Placas de poliestireno de 24 pozos (Corning) fueron recubiertas con una solución de colágena tipo I (Sigma) (12.5 µg/pozo) y colágena tipo IV (Sigma) (20 µg/pozo) en un volumen final de 200 mL y se almacenaron en refrigeración a 4 °C durante 16 horas para favorecer la formación de la capa de colágena. Posteriormente cada pozo fue lavado con amortiguador de fosfatos salino (PBS) 1X estéril pH 7.2-7.4.

Separación de las células mononucleares de sangre periférica por diferencia de gradiente

Se obtuvieron muestras de 15 mL de sangre periférica de individuos voluntarios sanos de entre 20 a 25 años de edad, sexo masculino, con un peso superior a los 60 kg; por venopunción humeral. La sangre se colectó en tubos vacutainer estériles de 4 mL con 7.5 mg de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) como anticoagulante (BD Vacutainer).

El volumen de sangre obtenido se diluyó en una relación 1:1 con PBS 1X pH 7.4. La suspensión obtenida se colocó en tubos de polipropileno sobre Ficoll (Lymphoprep/Axis Shield) ello se realizó cuidadosa y lentamente con una pipeta de transferencia de 10 mL de capacidad, cuidando no mezclar las fases. La proporción de éste gradiente correspondió a un volumen de Ficoll por cada dos volúmenes de la suspensión sanguínea. Los tubos se centrifugaron a 1062 g, con los valores de aceleración y frenado en 1 y 0 respectivamente por 20 min en una centrífuga Rotina 35 R (Hettich Zentrifugen).

Al cabo del tiempo de centrifugación, se observó la separación de la CMSP en una capa blanquecina sobre el Ficoll y por debajo del suero (Figura 4). En condiciones de esterilidad,

se extrajo cuidadosamente la capa correspondiente al concentrado de CMSP /sin retirar el suero) y se transfirió a un nuevo tubo. Para retirar el exceso de Ficoll que hubiera sido tomado, se realizaron dos lavados agregando de 10 a 12 mL de PBS estéril 1X y centrifugando a 382 g por 5 minutos.

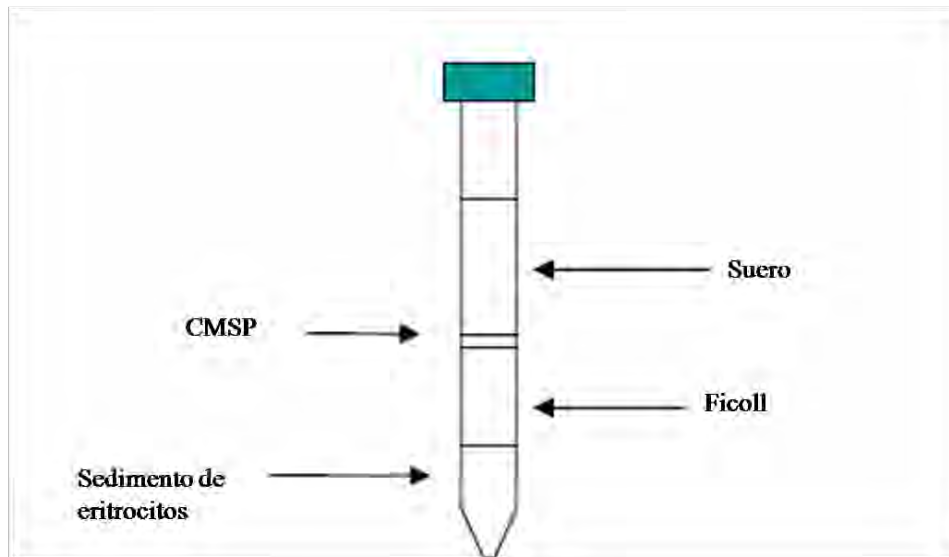


Figura 4. Separación de CMSPs por la técnica de diferencia de gradiente. Se esquematiza como se observa, una vez terminado el tiempo de centrifugación, el concentrado de células correspondientes a CMSPs de donde se recuperan por aspiración y sin retirar el suero.

Los sobrenadantes fueron decantados, y se golpeó el tubo suavemente para homogeneizar el botón celular. Para evaluar la viabilidad celular, se realizó una dilución 1:100 de la suspensión celular en azul tripano y se contaron las células vivas con ayuda de un contador automatizado de células (Countess/Invitrogen)

Estimulación con LPS de CMSPs expuestas a colágena IV

En las placas recubiertas con colágena tipo I, colágena tipo IV y sin recubrimiento se colocaron 1×10^6 células por pozo en un volumen final de 500 μ L de medio RPMI (Medio Roswell Park Memorial Institute).

Posteriormente las células fueron o no adicionadas con 5 μ g/mL de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* (Sigma). En los experimentos que así lo requerían (valoración de participación de MMPs en los efectos de colágena sobre CMSPs) también se agregó o no el inhibidor de metaloproteinasas, ácido bifenil sulfonil amino fenil propiónico (A. BSAFP) (Calbiochem) a diferentes concentraciones e incubadas durante diferentes tiempos, 30 minutos, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas; a 37°C, 5% CO₂.

Una vez completado el tiempo de incubación, se tomaron 480 μ L del sobrenadante de cada pozo y se congeló a -70°C hasta la posterior cuantificación de las citocinas por el método de arreglo citométrico en perlas (CBAs/Cytometric Bead Assay)) por citometría de flujo.

Determinacion intracelular de IL-10

Se incubaron las células tal como se describió previamente en presencia o no de colágena IV. Al añadir el LPS se adicionó también brefeldina A (BFA-A), 2.5 μ g/pozo (Sigma), un desacoplador del aparato de Golgi y por ende, de la secreción. Se incubaron durante 4 horas a 37°C, 16% CO₂, posteriormente se retiró el sobrenadante de las células y se agregó una solución de PBS con EDTA al 10% (Gibco) en frío durante tres minutos para despegar y coleccionar las células.

A las células coleccionadas se les adicionó 1.5 μ L del anticuerpo marcador de superficie de interés. Se utilizó el anticuerpo anti CD3 (BD Bioscience) acoplado al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), y anti CD14 (BD Bioscience) acoplado al fluorocromo Ficoeritrina-Cy7 (PE-Cy7) para identificar las poblaciones de linfocitos T y monocitos,

respectivamente. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de este tiempo se adicionaron 100 μ L de solución comercial de paraformaldehído (Invitrogen) y se incubó 15 minutos más en oscuridad a temperatura ambiente.

Las células se lavaron con PBS 1X con azida de sodio (NaN_3) al 0.1% y suero fetal bovino (SFB) al 5%. Las células se centrifugaron a 300-350 g por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se golpeó el tubo ligeramente para disgregar el botón celular. Se adicionaron 100 μ L de solución de permeabilización (Invitrogen) y 1.0 μ l del anticuerpo anti IL-10 (BD Bioscience) acoplado al fluorocromo ficoeirtrina (PE). Las muestras fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Terminada la incubación, las muestras fueron lavadas con solución de PBS+0.1% NaN_3 +5%SFB por centrifugación 5 minutos a 300-350 g. Se retiró el sobrenadante y se homogeneizó el botón celular en 100 μ L de PBS 1x. Las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACS Aria (BD Bioscience) y el programa Summit V4.3 (Dako Colorado Inc. 2006), obteniéndose el porcentaje de células productoras de IL-10, así como la expresión relativa de IL-10 a través de la determinación de la intensidad media de fluorescencia para PE.

Cuantificación de citocinas por el método de CBAs

Para la cuantificación de citocinas, se utilizó un kit comercial de CBA (Ensayo Citométrico en Perlas/Cytometric Bead Assay) (BD Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando para su evaluación el citómetro de flujo FACS Aria (BD Bioscience). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Summit V4.3 (DAKO Colorado Inc. 2006). Con este Kit de CBAs fue posible cuantificar simultáneamente las citocinas IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10, IL-1 β e IL-12 utilizando únicamente 50 μ L de muestra.

Cuantificación de proteínas totales en sobrenadante por el método de ácido bicinconínico

La concentración de proteínas totales de cada muestra se realizó utilizando el método del ácido bicinconínico comparado con una curva estándar de albúmina, para esto se utilizó el kit comercial de BCA (Ácido bicinconínico/Bicinchoninic acid) (Thermo scientific) y se determinó la absorbancia de las muestras por medio de un espectrofotómetro (Beckman Coulter), a una longitud de onda de 540 nm.

Determinación de la actividad relativa de MMP por zimografía

Para determinar la producción y actividad relativa de MMP presentes en cada muestra se realizaron zimogramas. Estos fueron realizados en un gel de poliacrilamida, constituido por un gel separador de poliacrilamida al 8%, que contenía 0.1% de gelatina derivada de piel de cerdo (Sigma) y un gel concentrador al 8% de poliacrilamida.

Se tomó el volumen correspondiente de cada sobrenadante de las CMSP estimuladas previamente con colágena tipo IV, equivalente a 5 μ g y se diluyó en una solución amortiguadora de carga, en este caso rojo fenol, para completar un volumen final de 10 μ L, mismo que se colocó en cada carril del gel.

Las muestras se sometieron a electroforesis a una intensidad de corriente de 72 volts a 4° C durante 3 horas.

Los geles obtenidos se lavaron 3 veces con una solución de Tritón X 100 (Sigma) durante 30 min cada lavado.

Una vez terminados los lavados, el gel se colocó en una solución amortiguadora de activación de metaloproteinasas (Tris 0.05 M, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ 0.02%, pH 7) y se incubó a 37° C durante 24 horas.

Terminada la incubación, el gel se tiñó con azul de Coomassie y se lavó tres veces con la solución decolorante y una vez con agua bidestilada.

La imagen del gel se capturó con un escáner y el análisis densitométrico se realizó con el programa ImageJ 1.42q (Wane Rasband NIH).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la cuantificación de citocinas, porcentajes celulares e intensidad media de fluorescencia (IMF) se analizaron con la prueba ANOVA de dos vías y la postprueba de Bonferroni. El valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

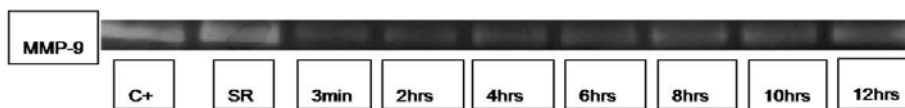
Para comparar entre dos condiciones se utilizó la prueba t-test pareada.

RESULTADOS

El contacto con colágena IV induce la secreción de MMP-9 por CMSP

Como un primer acercamiento, se realizó un curso temporal y se determinó el tiempo que requieren de estar en contacto las CMSPs con colágena tipo IV para secretar MMP-9 activa. Por zimografía observamos que la producción de MMP-9 con el estímulo de colágena tipo IV se incrementa significativamente desde las 8 horas de estimulación en comparación con la MMP-9 secretada por células no expuestas a colágena tipo IV. Además, el solo contacto de las CMSP con el poliestireno de la placa de cultivo es suficiente para inducir la producción de MMP-9, sin que a lo largo del tiempo sean capaces de alcanzar los niveles observados con el contacto con colágena tipo IV (8 h: SR vs Col IV: 110 vs 118.5 ± 2.1 ; 10h: SR vs Col IV: 112 vs 123 ± 1.4 ; 12h: SR vs Col IV: 110 vs 136 ± 2.8) (**Figura 5**).

a)



b)

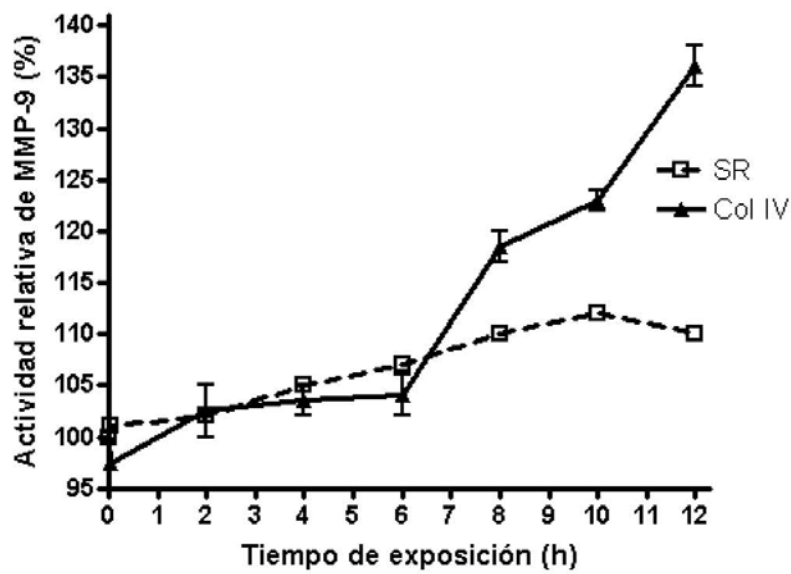


Figura 5. Colágena IV induce la expresión de MMP-9 en CMSP. a) Zimograma en el que se muestra la actividad relativa de la MMP-9 en el sobrenadante de CMSP expuestos a Col

IV durante 3 min, 2,4,6,8,10 y 12 horas(h). SR corresponde a CMSP incubados en placas sin recubrimiento con ColIV y C+ es el control positivo de actividad de MMP-9, que corresponde a MMP-9 secretada por células de la línea MCF7 expuestas a colágena IV. En cada carril del zimograma, se colocaron 5 µg de proteína total. b) Gráfica en la que se muestra el análisis densitométrico de los zimogramas realizados de forma independiente (n=3).

MMP-9 es necesaria para la secreción de IL-10 y otras citocinas por CMSP estimuladas por LPS

Se determinó la concentración requerida para que el inhibidor de metaloproteinasas (ácido bifeníl sulfonil amino fenil propiónico (A.BSAFP, Calbiochem) disminuyera la actividad de MMP-9 secretada por CMSP expuestas a colágena tipo IV durante 8 y 12 horas. El A.BSAFP se agregó durante el tiempo de exposición a concentraciones de 50, 100, 200 y 300 µM. Se observó que con 50 µM de A.BSAFP disminuye la actividad de la MMP-9 $1.5\% \pm 1.3$, mientras que las concentraciones de 100, 200 y 300 uM la disminuyen en $7.3\% \pm 1.3$, $8.1\% \pm 0.4$ y $6.5\% \pm 3.1$, respectivamente (Figura 6).

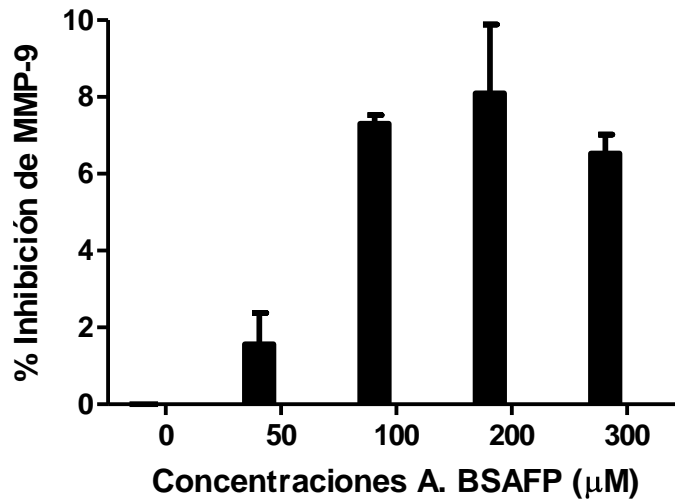


Figura 6. Capacidad de la inhibición del A. BSAFP sobre la actividad de MMP-9
Se muestra el porcentaje de inhibición relativa obtenido con diferentes dosis (50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del inhibidor de MMPs A.BSAFP. SR: CMSP colocadas en un pozo sin recubrimiento.

A fin de evaluar el efecto que la inhibición parcial de MMP-9 tiene sobre la capacidad de producción de IL-10 por parte de las CMSPs expuestas a Col IV, expusimos CMSPs durante 16 horas a colágena tipo I o IV antes de agregar, por cuatro horas más LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el inhibidor de metaloproteinasas A.BSAFP (100 μM). Pasado el tiempo de estimulación, se centrifugó la placa y del sobrenadante recuperado se cuantificaron las citocinas IL-10, TNF- α e IL-1 β por el sistema de CBAs.

Los resultados mostraron que las CMSP en contacto con colágena tipo I, colágena tipo IV y pozos sin recubrimiento inducen una producción de IL-10, TNF- α e IL-1 β en concentraciones menores a 10 pg/mL (IL-10, SR: 6.07 ± 0.53 ; Col I: 6.42 ± 1.12 ; Col IV: 6.07 ± 2.43 . TNF- α , SR: 9.50 ± 1.47 ; Col I: 8.99 ± 6.73 ; Col IV: 6.44 ± 1.53 . IL-1 β , SR: 4.53 ± 1.20 ; Col I: 6.14 ± 4.26 ; Col IV: 9.73 ± 8.00) (Figura 7).

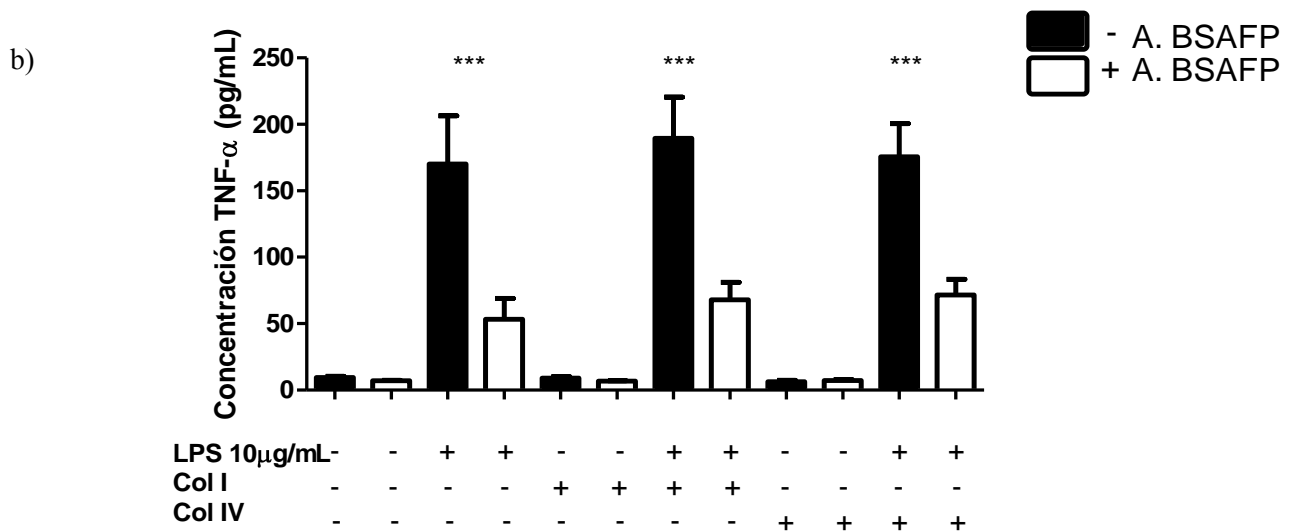
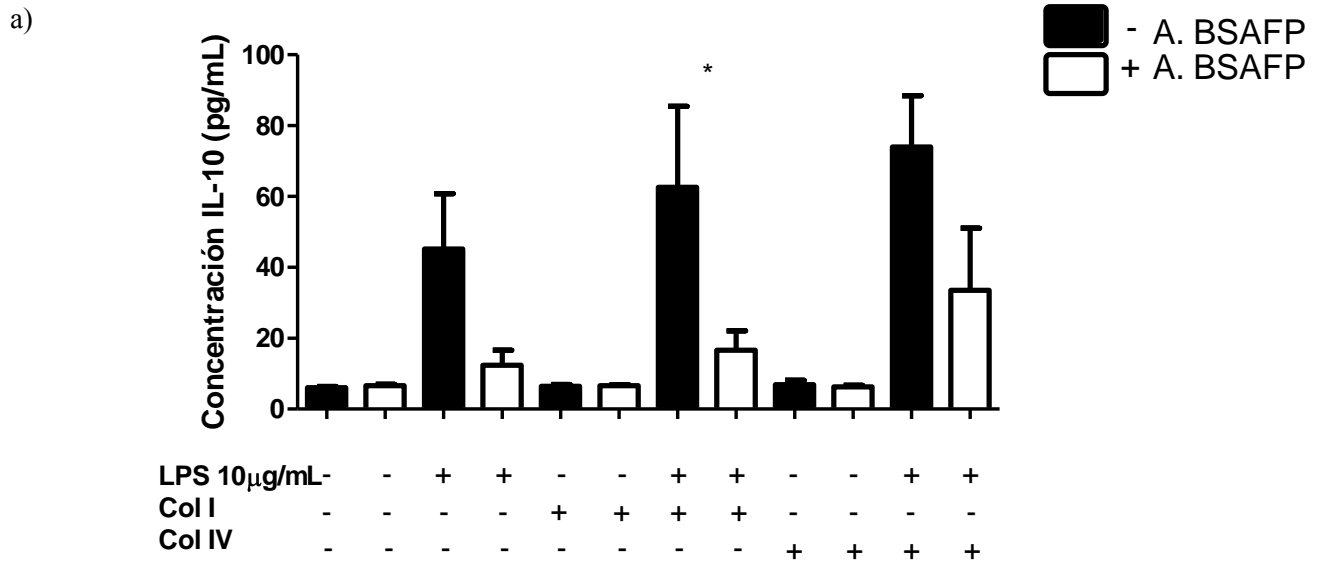
Concordantemente con la literatura, la secreción de IL-10, TNF- α e IL-1 β es inducida por la presencia del LPS. En este mismo contexto, las CMSP previamente en contacto con colágena tipo I y más aún con colágena tipo IV, secretaron mayor cantidad de IL-10. Sin embargo, la producción de IL-10(Figura 7a), TNF- α (Figura 7b) e IL-1 β (Figura 7c) inducida por el LPS no es modificada por la presencia de las colágenas. Interesantemente, la secreción de todas las citocinas analizadas fue dependiente de MMP-9, pues en presencia del A. BSAFP, la concentración de IL-10, TNF- α e IL-1 β disminuyó significativamente (Tabla 2).

Estímulo	Concentración de citocinas (pg/mL)					
	IL-10	<i>P</i> *	TNF- α	<i>P</i> *	IL-1 β	<i>P</i> *
SR	6.07 \pm 0.53		9.50 \pm 1.47		4.53 \pm 1.20	
LPS	45.23 \pm 31.13		170.10 \pm 72.51		145.70 \pm 64.05	
LPS + A.BSAFP	12.36 \pm 8.47	0.012	53.17 \pm 31.78	0.034	70.55 \pm 52.12	0.024
Col I + LPS	62.61 \pm 45.74		189.6 \pm 61.92		145.70 \pm 22.48	
Col I + LPS + A.BSAFP	16.65 \pm 10.89	0.025	68.11 \pm 26.02	0.016	45.78 \pm 12.99	0.012
Col IV + LPS	73.93 \pm 25.12		175.60 \pm 71.53		189.40 \pm 37.83	
Col IV + LPS + A.BSAFP	33.55 \pm 34.94	0.045	49.85 \pm 23.84	0.017	52.62 \pm 22.54	0.042

Tabla 2. Producción de IL-10, TNF- α e IL-1 β por CMSP estimuladas con LPS, expuestas o no a colágenas, y en ausencia o presencia de un inhibidor de metaloproteinasas (A. BSAFP). * Prueba t-studen (P<0.05)

LPS: CMSP estimuladas con 10 μ g/mL de lipopolisacárido de *E. coli*; LPS+A.BSAFP: CMSP estimuladas con 10 μ g/mL de lipopolisacárido de *E. coli* y en presencia de un inhibidor de metaloproteinasas (A. BSAFP); Col I+LPS: CMSP estimuladas con 10 μ g/mL de lipopolisacárido de *E. coli* y puestas en contacto con colágena tipo I (12.5 μ g/mL); Col I+LPS+A.BSAFP: CMSP estimuladas con 10 μ g/mL de lipopolisacárido de *E. coli* y puestas

en contacto con colágena tipo I (12.5 $\mu\text{g/mL}$) y en presencia de A.BSAFP; Col IV+LPS: CMSP estimuladas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolisacárido de *E. coli* y puestas en contacto con colágena tipo IV (20 $\mu\text{g/mL}$); Col IV+LPS+A.BSAFP: CMSP estimuladas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolisacárido de *E. coli* y puestas en contacto con colágena tipo IV (20 $\mu\text{g/mL}$) y en presencia de A.BSAFP.



c)

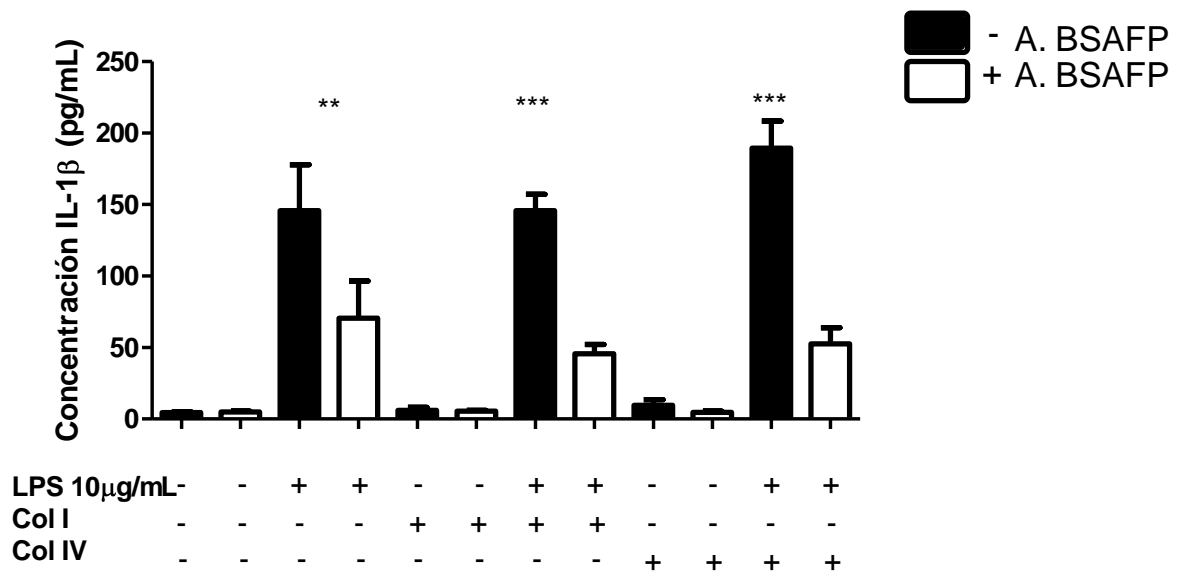


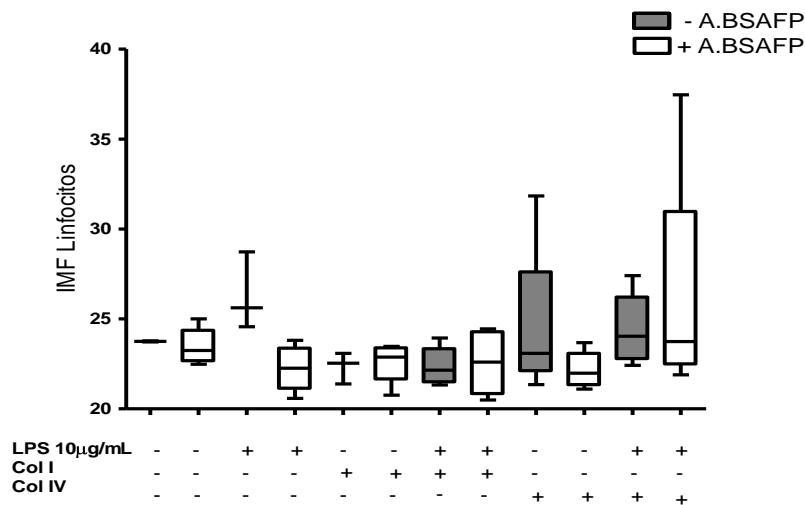
Figura 7. Efecto de la MMP-9 sobre la producción de IL-10, TNF- α e IL-1 β . Se determinaron concentraciones de a) IL-10, b) TNF- α e c) IL-1 β por el método de arreglo citométrico en perlas (CBAs) en los sobrenadantes de CMSP de sujetos sanos (n=4) aisladas por gradientes de densidad. Las CMSP se sometieron a diferentes condiciones durante 16 horas en total. SR: pozo sin recubrimiento; SR + LPS: pozo sin recubrimiento (16 h) y LPS(10 μ g/mL, últimas 4 h); Col I: recubrimiento con colágena tipo I; Col I +LPS: recubrimiento de colágena tipo I(16 h) y LPS (10 μ g/mL, últimas 4 h); Col IV: CMSP recubrimiento de colágena tipo IV (16 h); Col IV +LPS: recubrimiento de colágena tipo IV(16 h) y LPS (10 μ g/mL, últimas 4 h). Para cada condición hubo, se agregó (+ A. BSAFP) o no (- A. BSAFP) el inhibidor de metaloproteinasasa tipo I, A.BSAFP. Cada barra representa los valores promedio. Se realizó la prueba de ANOVA de dos vías con postprueba de Bonferroni. P<0.05.

La concentración intracelular de IL-10 se disminuyó solamente en linfocitos expuestos a colágenas y LPS

Con el fin de determinar si la producción de IL-10 estaba a cargo de alguna estirpe en particular, realizamos inmunomarcaje para linfocitos (células CD3+) y monocitos (células CD14+) en conjunto con permeabilización y detección de IL-10 intracelular, después de incubar las células con BFA A (bloqueador de Golgi que impide la secreción proteica) para concentrar la citocina dentro de las células. En las diferentes condiciones de estímulo, en presencia o ausencia del inhibidor A, BSAFP, no observamos diferencias significativas, ni entre la proporción de linfocitos y monocitos con IL-10 (Col I+LPS vs Col I+LPS+A.BSAFP: 7.48 ± 2.37 vs 4.77 ± 1.12), ni entre la expresión relativa de IL-10 (expresada por la intensidad media de fluorescencia, MIF) en linfocitos (Figura 8 a) y monocitos (Figura 8 b).

a)

LINFOCITOS



b)

MONOCITOS

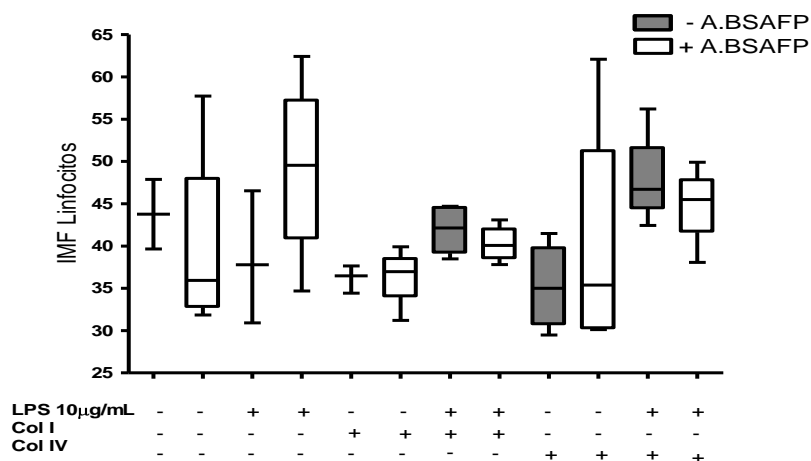


Figura 8. A. BSAFP no induce cambios en IL-10 producida por linfocitos y monocitos. Mediante la determinación de la IMF, se valoró la concentración relativa de IL-10 de: a) linfocitos T (CMSP CD3+) y b) monocitos (CMSP CD14+) de sujetos sanos (n=4) separados por diferencia de gradientes y expuestos a diferentes condiciones. SR: pozo sin recubrimiento; SR + LPS: pozo sin recubrimiento (16 h) y LPS(10 µg/mL, últimas 4 h); Col I: recubrimiento con colágena tipo I; Col I +LPS: recubrimiento de colágena tipo I(16 h) y LPS (10 µg/mL, últimas 4 h); Col IV: CMSP recubrimiento de colágena tipo IV (16 h); Col IV +LPS: recubrimiento de colágena tipo IV(16 h) y LPS (10 µg/mL, últimas 4 h). Para cada condición hubo, se agregó (+ A. BSAFP) o no (- A. BSAFP) el inhibidor de metaloproteinasasa tipo I, A.BSAFP. Cada barra representa los valores promedio. Se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías y como postprueba Bornferroni (P<0.005).

DISCUSIÓN

La infiltración de leucocitos del torrente sanguíneo hacia los tejidos es uno de los eventos claves en la respuesta inflamatoria local. Es evidente que durante la migración de los leucocitos a los sitios lesionados, existen múltiples señales, tanto solubles como derivadas por contacto directo, que modifican la funcionalidad de leucocitos y células residentes del tejido. La información más abundante se refiere a la capacidad que las células epiteliales tienen para secretar quimiocinas como IL-8 y citocinas del tipo TNF- α , que al llegar a torrente circulatorio activan a las células circulantes y favorecen los fenómenos de rodamiento y diapédesis³⁷. De la misma manera se sabe que la liberación de IFN γ por parte de las células endoteliales favorece la migración transendotelial de linfocitos, así como también las citocinas producidas por neutrófilos, monocitos y linfocitos, pueden activar células endoteliales y linfocitos CD8+ de piel³⁸.

Ahora bien, aunque existe información acerca de la interacción célula-célula que ocurre entre endotelios y leucocitos para los procesos de rodamiento y migración, con interacción de selectinas e integrinas, participación de moléculas como CD11b y PECAM; existen menos evidencias de las consecuencias que las interacciones célula a célula tienen sobre la respuesta inflamatoria de leucocitos. El reconocimiento de la P-selectina de endotelio por L-Selectina y CD31 de neutrófilos induce en éstos la producción de especies reactivas de oxígeno y degranulación³⁶. En monocitos, el contacto con células endoteliales incrementa los transcritos para TNF- α e IL-1 β ^{38,39}. También en monocitos, el bloqueo de CD43 o leucosialina, una proteína transmembranal involucrada en la adhesión y activación leucocitaria, que normalmente se une a la E-selectina de las células endoteliales, disminuye dramáticamente la capacidad de producción de TNF- α ⁴⁰.

En este contexto, menos evidencias existen de las consecuencias que el reconocimiento de la MEC tiene sobre la respuesta inflamatoria. Dado que la remodelación de la MEC es un evento asociado a la infiltración de células inflamatorias y que existen reportes de que los fragmentos de fibronectina son capaces de actuar como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)⁴¹, que al ser reconocidos por receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), inducen la activación de monocitos, caracterizada por la secreción de IL-1 β y TNF- α , exploramos en trabajos previos si existía una respuesta diferencial frente al reconocimiento a colágena por parte de células inflamatorias de sangre periférica de sujetos psoriásicos y sanos. En ese primer acercamiento fue evidente que la capacidad de secreción de IL-10 por parte de las CMSP aumentaba sí las células se exponían a colágena IV y luego eran estimuladas con LPS³³. Es conocido que el contacto de leucocitos con componentes de la MEC, como las colágenas, fibronectina y proteoglicanos, induce la expresión de MMPs. En modelos murinos, en los que se induce inflamación a nivel peritoneal y a nivel sistema nervioso central, se sabe que las células logran llegar al sitio de lesión sintetizando MMP-9, -7 y -12^{42, 43,44}. Nosotros exploramos sí en el sistema de estimulación que previamente utilizamos, había secreción de MMP-9 activas hacia el medio por parte de CMSP de sujetos sanos expuestas a colágena tipo IV. Obtuvimos que desde las 8 horas y hasta las 12 horas que seguimos la estimulación *in vitro*, las CMSP secretan MMP-9 activa de manera diferencial respecto a las células no expuestas a colágena tipo IV. Las CMSP son capaces de expresar MMP-9 activa aún en condiciones sin recubrimiento con colágena, lo cual sugiere que la generación de contactos focales sobre la superficie de poliestireno de las placas de cultivo, es suficiente para inducir cascadas de señalización que culminan en la expresión y secreción de MMP-9 activa. Esto no se observa en otro tipo de células como las MCF7, una línea celular derivada de carcinoma mamario humano que si no se exponen a componentes de matriz extracelular que recubran las placas de cultivo, presentan una actividad de MMP-9 no

detectable por zimografía⁴⁵. Es factible que estas diferencias se deban a las vías de señalización que están activas diferencialmente en uno y otro tipo de células.

Interesantemente, encontramos que la secreción de citocinas IL-10, TNF- α e IL-1 β se disminuye significativamente al inhibir la actividad de MMP-9. Llama la atención que este efecto de inhibición en la producción de MMP-9 activa se da aún cuando la inhibición de la actividad es parcial (del 10%). Las consecuencias biológicas de esto se pueden deber a diferentes factores. Por un lado es factible que la actividad de MMPs sea requerida para la remodelación de la MEC, y de dicho proceso se generen fragmentos de colágena que se reconozcan como DAMPs por receptores, como las integrinas e incluso TLRs, diferentes a los que reconocieron los componentes íntegros de la MEC, de tal manera que se favorezca la respuesta inflamatoria⁴⁶. Otra posibilidad, dado los tiempos largos de incubación (de 16 horas) que utilizamos es que la actividad de estas MMPs, específicamente MMP-9, se requiere para la liberación y activación de otros componentes, entre estos, las citocinas TNF- α e IL-1 β ³⁰. Lo que llama la atención al respecto es que todas las citocinas exploradas, tanto inflamatorias, como anti-inflamatorias presentan este comportamiento. Pudiera ser entonces que el fenómeno este más relacionado con los mecanismos de transporte vesicular y secreción de citocinas, que con la síntesis de las mismas. Esto se ve reforzado por el hecho de que realmente no existen diferencias significativas cuando se analiza IL-10 a nivel intracelular, independientemente de que se conserve la actividad de MMP-9 en el cultivo.

CONCLUSIONES

El contacto con colágena tipo I y tipo IV favorece la capacidad de secreción de IL-10 por parte de CMSP estimuladas con LPS. Este fenómeno es dependiente de la actividad de MMP-9.

La producción de TNF- α e IL- β inducida LPS en las CMSP, es dependiente de MMP-9, sin embargo, el contacto de las CMSP con colágenas no modifica la producción de éstas citocinas.

REFERENCIAS

1. Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol.* 1977; 86:183-276.
2. Haitian Lu, Weiming Ouyang, and Chuanshu Huang. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol. Cancer Res.*, 2006; 4: 221 - 233.
3. Regueiro RJ, López LC, González RS, Martínez NE. *Inmunología, biología y patología del sistema inmune 3º edición.* España. Panamericana,2006.
4. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860– 867.
5. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846–852.
6. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 2004;14:433 –439.
7. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002;2: 965–975.
8. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibits proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF, PGE2 and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101:890–898.
9. Morris T et al. Dichotomy in duration and severity of acute inflammatory responses in humans arising from differentially expressed proresolution pathways . *Proc Natl Acad Sci.* 2010; 107: 8842-8847
10. Couper NK, Blount GD, Riley ME. The master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*2008; 160: 2771-2777.
11. Carman VC. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by “invadosome-like protusions”.*Journal of Cell Science* 2009;122: 3025-3035

12. Parks CW, Wilson LC, López-Boado SY. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity 2004(4)617-629.
13. Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnet NW, Hauser SL. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. Journal of Immunology 1995; 154: 4379-4389.
14. Chung A, Gao Q, Kao WJ. Macrophage matrix metalloproteinase -2/-9 gene and protein expression following adhesion to ECM-derived multifunctional matrices via integrin complexation. Biomaterials 2007; 28: 285-298.
15. Friedl P, Weigelin B. Intersittial leukocyte migration and immune functions. Nature Immunology 2008; 9: 960-969.
16. Har-El R, Tanzer ML. Evolution of the extraellular matrix in invertebrates. FASEB J 1993; 7: 1115-1123.
17. Adair -Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. The International Journal of Biochemistry and cell biology 2008; 40: 1101-1110.
18. Ortega N, Werb Z. New functional roles for non collagenous domains of basement membranes collagens. Journal of Cell Science 2002; 115: 4201-4214.
19. Kadler EK, Baldock C, Bella J, Boot-Handford PR. Collagen at glance. Journal of cell science 2007; 120: 195-19585

20. Tanzer LM. Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci* 2006;11: 326-331.
21. Bossman TF, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 2003; 200:423-428.
22. Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *Journal of molecular medicine* 1998; 76: 253-265.
23. LeBleus SV, MacDonald B, Kaluri R. Structure and functions of basement membranes. *Exp Biol Med* 2007; 232:1121-1129
24. Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci* 2010;
25. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Biol.* 2001; 17: 463–516.
26. Somerville PTR, Oblander AS, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 2003; 4:1-11.
27. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.*1999;274: 21491–21494.
28. Piccard H, Van den Steen EP, Opdenakker G. Hemopexin domains as multifunctional liganding models in matrix metalloproteinases and other proteins. *Journal of Leukocyte biology* 2007; 81: 870-892.

29. Mott DJ, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current opinion in cell biology* 2004, 16:558-564
30. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Structure, function and biochemistry. *Circ Res.*2003;92: 827-839
31. Saphiro DS. Matrix metalloproteinases degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Current opinion in cell biology* 1998; 10:602-608
32. Bianchi EM. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:1-5.
33. Nickoloff BJ, Qin JZ, Nestle FO. Immunopathogenesis of psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 33: 45-56
34. Finnegan A, Kaplan CD, Cao Y, Eibel H, Glant TT, Zhang J. Collagen -induced arthritis is exacerbated in IL-10-deficient mice. *Arthritis Res Ther.* 2003;5: 18-24.
35. Sánchez-López JA. Respuesta de Células Mononucleares de Sangre Periférica de sujetos Psoriásicos y no Psoriásicos expuestas a proteínas de Matriz Extracelular (tesis de licenciatura). D.F., México: Universidad La Salle, 2008.
36. Malo JR. Estimulación de células mononucleares expuestas a colágena I y IV en pacientes con y sin psoriasis. (trabajo de investigación cuasiexperimental) D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México 2009.

37. Ley K, Laudama C, Cybulsky IM, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte cascade adhesion updated. *Nature Reviews* 2007; 7: 678-689.
38. Ortega C, Fernández-A S, Carrillo MJ, Romero P, Molina JI, Moreno CJ, Santamaría M. IL-17 producing CD8 T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *Journal of Leukocyte Biology* 2009; 86: 435-443
39. Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *American journal of pathology* 2008; 172: 1-7
40. McEvoy MC, Jutila AM, Tsao SP, Cooke PJ, Butcher CE. Anti CD43 inhibits monocyte endothelial adhesion in inflammation and atherogenesis. *Blood* 1997; 90: 3587-3594.
41. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *Journal of Pathology* 2008; 214: 161-175.
42. Brundula V, Rewcastle BN, Metz ML, Bernard CC, Yong WE. Targeting leukocyte MMPs and transmigration, minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125: 1297-1308.
43. Kolaczowska E, Lelito M, Kozakiewicz E, Rooijen N, Plytycz B, Arnold B. Resident peritoneal leukocytes are important sources of MMP-9 during zymosan peritonitis: Superior contribution of macrophages over mast cells. [Immunology Letters](#) 2007; 113: 99-106.

44. Kolaczowska E et al. Gelatinase B/Matrix metalloproteinase 9 contributes to cellular infiltration in a murine model of zymosan peritonitis. *Immunobiology* 2006; 211: 137-148.
45. Robledo T, Arriaga-Pizano L, López-Pérez M, Salazar EP. Type IV collagen induces STAT5 activation in MCF7 human breast cancer cells. *Matrix Biol.* 2005; 24: 469-477.
46. Kono H, Rock LK. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 279-289.