



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**“MECANISMOS MOLECULARES EN EL
DESARROLLO DE ENFISEMA EN PACIENTES
CON FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIÓL. ADRIÁN MUNGUÍA REYES

TUTORA DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO CEMO

COMITÉ TUTOR: DR. MOISES EDUARDO SELMAN LAMA

DR. DAVID KERSHENOBICH STALINIKOWITZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/441/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **14 de marzo de 2011** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **MUNGUÍA REYES ADRIÁN** con número de cuenta **99195652** con la tesis titulada **"Mecanismos moleculares en el desarrollo de enfisema en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática."**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. ANNIE PARDO CEMO**:

Presidente: DR. DAVID KERSHENOBICH STALINIKOWITZ
Vocal: DR. JORGE ANTONIO GARCÍA ÁLVAREZ
Secretario: DR. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
Suplente: DRA. TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de agosto de 2011

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/ mnm

Agradezco a las siguientes instituciones por el apoyo brindado para la realización de este proyecto de Maestría

- ❖ Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de pertenecer a este programa de reconocimiento a nivel mundial.**
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por apoyarme con una beca (No. de registro: 225560) durante el desarrollo de este proyecto.**
- ❖ A mi tutora la doctora Annie Pardo Cemo, por estar al pendiente de este proyecto, apoyándome y guiándome durante el desarrollo del mismo, además de permitirme pertenecer a este excelente grupo de investigación.**
- ❖ Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas” por la aportación de material biológico.**
- ❖ Al Dr. Moises Selman Lama por su interés, apoyo y aporte de conocimientos.**
- ❖ Al Dr. David Kershenobich Stalinikowitz por sus aportes en el desarrollo de este proyecto**

Agradecimientos

A la UNAM por ser mi casa de estudios, por darme el acceso a todo lo necesario para mi formación profesional y personal.

A mis papás porque siempre están conmigo, apoyándome y guiándome, disfrutando de mis alegrías y preocupándose por mi bienestar, a mis hermanos porque siempre estamos juntos como la familia que somos. A Bere y toda la familia Medina Munguía, Juan Carlos, Julio Cesar y Angie, a todos lo quiero mucho.

A mi tutora la doctora Annie Pardo porque siempre me ha apoyado, por la confianza que me ha tenido y porque me ha dado la oportunidad de pertenecer a este grupo de trabajo.

Al doctor Moises Selman por su interés, apoyo en mi trabajo y su siempre buena disposición.

Al doctor Jorge García-Álvarez por su invaluable apoyo, por ayudarme con las técnicas que me eran muy complicadas y por estar ahí con su conocimiento y atención.

A Yis por compartir este tiempo conmigo, apoyando, guiando y presionando, por darme la mano para pronto poder darle la vuelta al mundo.

A mis amigos que estuvieron conmigo durante este tiempo en el posgrado, Flaw, Yire, Pablo, Luis Placido (Y Paul), David, Yahir, Miguel Negreros, Ricardo, por hacer más relajado, compartir y crear muchos momentos agradables.

A quienes comparten su tiempo conmigo y a los que nunca puedo ver pero sé que siempre están ahí: Bernardo, Jazz, Angel, Hugo, Luis García.....

A Reme por cuidar de mi en el laboratorio, apoyándome siempre con su buena disposición y mucha amabilidad; a sus alumnas de taller Semi y Mariel, por hacer del ambiente del laboratorio un lugar siempre agradable.

*La felicidad es sólo estar en paz con uno mismo,
mirarnos y recordar que no hemos hecho
demasiado daño a los demás .*

José Saramago

*Si nos paramos a pensar en las pequeñas cosas,
llegaremos a entender las grandes.*

José Saramago

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Resumen	iii
Abstract	v
Introducción	1
Matriz Extracelular.....	3
Metaloproteasas de Matriz.....	4
Dominios Estructurales de las MMPs.....	4
Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	8
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica y Enfisema Pulmonar.....	10
Fibrosis Pulmonar Combinada con Enfisema.....	11
Objetivo	14
Material y Métodos	15
Muestras Biológicas.....	15
Determinación de Proteína Total.....	15
Zimografía.....	16
Inmunohistoquímica.....	17
Ensayos Bioplex.....	18
ELISA ET-1.....	19
TGF α	20
TGF- β	21
Análisis Estadísticos.....	22
Resultados	23

Determinación de Proteínas.....	23
Conteo Celular Diferencial.....	24
Análisis por zimografía en gelatina de MMP-2 y MMP-9 en LBA.....	24
Determinación Cuantitativa Simultanea de MMP's en LBA.....	26
MMP-9.....	27
MMP-2.....	27
MMP-1.....	28
MMP-7.....	28
MMP-12.....	29
MMP-3 yMMP-13.....	30
Immunolocalización de MMP-9 en Tejido Pulmonar.....	30
Análisis Cuantitativo Simultaneo de Citocinas en LBA.....	32
IL-8.....	32
IL1- β	32
IL-5.....	33
PDGF-B.....	34
TNF- α	34
Determinación de Concentración de ET-1 en LBA.....	35
Determinación de TGF- β en LBA.....	35
Determinación de TGF- α en LBA.....	36
Discusión.....	37
Conclusión.....	43
Bibliografía.....	44

Índice de figuras

Figura I 1. Micrografía electrónica de barrido de pulmón donde se observa la estructura de los alvéolos.....	2
Figura I 2. Micrografía electrónica de transmisión en tejido pulmonar donde se observan los componentes principales de los alvéolos.....	2
Figura I 3.- Dominios estructurales de la familia de MMPs.....	6
Figura 1. Promedio de la concentración de proteína $\mu\text{g/mL}$ de cada grupo después de concentrar 10 veces.....	23
Figura 2. Conteo celular diferencial de LBA.....	24
Figura 3. Zimografías con gelatina de LBA de muestras de FPCE, FPI y control. Las muestras de FPCE presentan una mayor actividad gelatinolítica de MMP-9 en comparación con las muestras de FPI.....	25
Figura 4. Densitometría de las bandas de actividad de MMP-9 geles 2a y 2b, $*(p<0.01)$	26
Figura 5. Concentración de MMP-9 en LBA . $* p< 0.05$ medida mediante ensayo de bioplex.....	27
Figura 6. Concentración de MMP-2 en LBA medida mediante ensayo de bioplex.....	28
Figura 7 Concentración de MMP-1 en LBA medida mediante ensayo de bioplex.....	28
Figura 8. Concentración de MMP-7 en LBA medida mediante ensayo de bioplex.....	29

Figura 9. Concentración de MMP-12 en LBA medida mediante ensayo de bioplex.....	29
Figura 10: Inmunolocalización de MMP-9 en tejido pulmonar de pacientes con FPI y FPCE magnificación 40X. La enzima inmunorreactiva se observó en células epiteliales (flecha en A y C) y focos de fibroblastos (D) en muestras de ambos grupos y en los tejidos de FPCE se observó la enzima en neutrófilos (B) asociados a vasos sanguíneos. E: Control Negativo.....	31
Figura 11. Concentración de IL-8 en LBA * $p < 0.05$ medida mediante ensayo de bioplex.....	32
Figura 12 Concentración de IL1- β en LBA medida mediante ensayo de bioplex...	33
Figura 13 Concentración de IL-5 en LBA medida mediante ensayo de bioplex....	33
Figura 14 Concentración de PDGF-B en LBA medida mediante ensayo de bioplex.....	34
Figura. 15 Concentración de TNF- α en LBA medida mediante ensayo de bioplex.....	34
Figura 16 Concentración de ET-1 en LBA * $p < 0.01$ Obtenida mediante ensayo inmunoenzimatico.....	35
Figura 17 Concentración de TGF- β en LBA * $p < 0.05$ Obtenida mediante ensayo inmunoenzimatico.....	36
Figura 18 Concentración de TGF- α en LBA Obtenida mediante ensayo inmunoenzimatico.....	36

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) se caracteriza principalmente por la activación y proliferación de fibroblastos/miofibroblastos además de la acumulación exagerada de matriz extracelular, lo que conlleva a una desorganización de la arquitectura pulmonar que interfiere con la función del órgano y termina siendo letal. Afecta predominantemente a individuos mayores de 50 años, es irreversible y habitualmente letal en un periodo corto de tiempo.

Por otro lado el enfisema pulmonar es una enfermedad fuertemente asociada al tabaquismo que se caracteriza por la degradación excesiva del parénquima pulmonar además de apoptosis de células epiteliales y endoteliales alveolares lo que conduce a la pérdida irreversible de alveolos pulmonares.

En este contexto, tanto la fibrosis pulmonar idiopática como el enfisema tienen características clínicas y patológicas diferentes y se consideran enfermedades distintas. Se ha descrito en humanos una nueva entidad clínica de fibrosis pulmonar combinada con enfisema (*FPCE*) en individuos fumadores de cigarrillos. De manera importante, los pacientes con *FPCE* desarrollan hipertensión arterial pulmonar severa y presentan una tasa de supervivencia significativamente menor que los pacientes con FPI.

En este estudio se midió la concentración de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12 y MMP-13, de las citocinas IL-1 β , IL-5 e IL-8, y los factores de crecimiento TNF- α , PDGF-b, TGF- α , TGF- β y Endotelina-1 (ET-1) en lavados bronquioalveolares (LBA) de pacientes con FPI, *FPCE* y controles. Adicionalmente la MMP-9 fue inmunolocalizada en tejidos de pacientes con FPI y

FPCE y su actividad fue evaluada por zimogramas de gelatina. El grupo de FPCE resultó con concentraciones significativamente mayores de MMP-9 (5180.7 ± 1741 *versus* 2662.5 ± 718 pg/mL en FPI, $p < 0.05$) y TGF- β (18.16 ± 5.3 *versus* 11.9 ± 2.2 pg/mL en FPI, $p < 0.05$) en comparación con los pacientes con FPI, por otro lado IL-8 resultó significativamente incrementada en FPI en comparación con FPCE (208.5 ± 101.5 *versus* 63.97 ± 46 pg/mL; en FPCE $p < 0.01$). En zimografías, los LBA de pacientes con FPCE mostraron una mayor actividad gelatinolítica de pro-MMP-9 y MMP-9 en comparación con LBA de pacientes con FPI. La inmunolocalización de MMP-9 en tejidos de pacientes con FPCE se presentó principalmente en células epiteliales, fibroblastos y neutrófilos, y en los tejidos de pacientes con FPI se presentó en células epiteliales, fibroblastos localizados en focos y macrófagos.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by the activation and proliferation of fibroblasts/myofibroblasts in addition to the excessive accumulation of extracellular matrix, leading to disruption of lung architecture which interferes with organ function and ends up being lethal. It predominantly affects people over 50 years, is irreversible and usually fatal within a short period of time. On the other hand pulmonary emphysema is a disease strongly associated with smoking that is characterized by excessive degradation of lung parenchyma and apoptosis of alveolar epithelial and endothelial cells leading to irreversible loss of pulmonary alveoli.

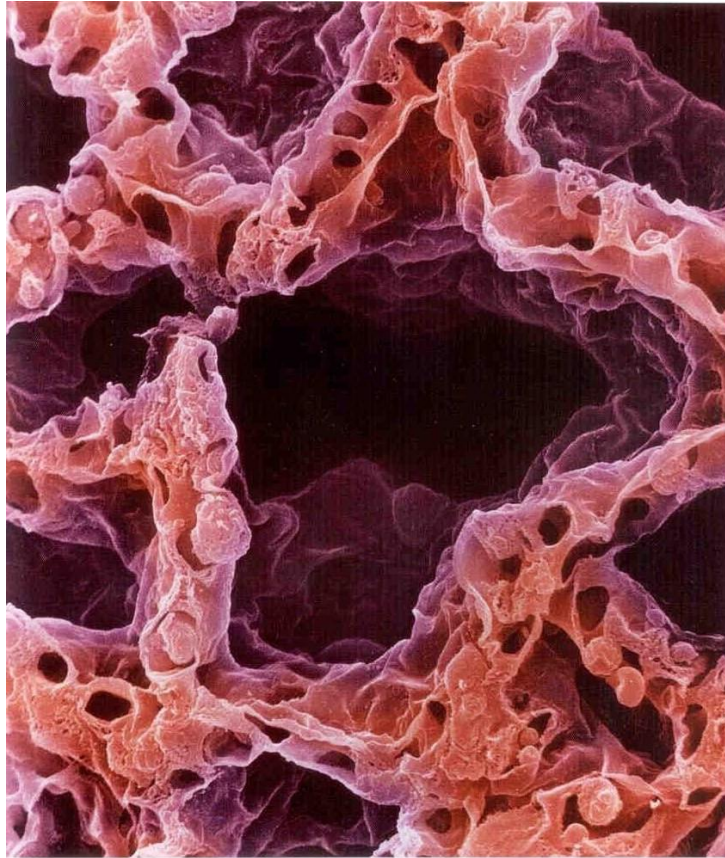
In this context, idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema, have different clinical and pathological features and are considered separate diseases. In humans has been described a new clinical entity of combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) in smokers. Importantly, patients with CPFE develop severe pulmonary hypertension and have a significantly lower survival rate than patients with IPF.

This study measured the concentration of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12 and MMP-13, cytokines IL-1 β , IL-5 and IL- 8, and growth factors TNF- α , PDGF-b, TGF- α , TGF- β and endothelin-1 (ET-1) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with IPF, CPFE and controls. Additionally, the MMP-9 was immunolocalized in tissues from patients with IPF and CPFE and its activity was evaluated by gelatin zymograms. CPFE group resulted in significantly higher concentrations of MMP-9 (5180.7 *versus* 2662.5 +1741 + 718 pg / mL in IPF, p

<0.05) and TGF- β (09.11 *versus* 18.16 + 5.3 + 2.2 pg / mL in IPF, p <0.05) compared with patients IPF, on the other hand IL-8 was significantly increased in IPF compared with CPFE (208.5 + 101.5 *versus* 63.97 + 46 pg / mL; in CPFE p <0.01). In zymography, the BALF of patients CPFE showed increased gelatinolytic activity of pro-MMP-9 and MMP-9 compared to BALF from patients with IPF. The MMP-9 immunolocalización in tissues from patients with CPFE occurs primarily in epithelial cells, fibroblasts and neutrophils, and tissue of patients with IPF is present in epithelial cells, fibroblasts and macrophages localized in foci.

INTRODUCCIÓN

El pulmón es un órgano en el que se lleva a cabo el intercambio gaseoso de la sangre, la cual recibe oxígeno y libera dióxido de carbono, este intercambio se lleva a cabo en los alveolos (fig. I 1). El número de alvéolos en los pulmones humanos es aproximadamente de 600 millones, sus paredes están formadas por células epiteliales, y están cubiertas por una extensa red de vasos capilares. El epitelio alveolar está conformado por dos tipos de células, los neumocitos tipo I, que son planos y con un núcleo sobresaliente en la superficie alveolar y los neumocitos tipo II (Fig. I 2) que son células con bordes redondeados y superficie con microvellosidades; este tipo celular produce el líquido surfactante, el cual es secretado por los alvéolos y reduce la tensión superficial, lo que permite que los alvéolos se distiendan y desinflen en el proceso de la ventilación, además de proveer humedad a la superficie, lo cual es necesario para llevar eficientemente el intercambio gaseoso (1). La matriz extracelular que compone al parénquima pulmonar, está compuesta de una gran cantidad de moléculas, en las que incluye: colágenas, elastina, proteoglicanos y fibronectinas, y la lámina basal que está compuesta por lamininas, entactina y colágena tipo IV entre otros(2).



Alveolus in the lung. © Dr. David Phillips/Visuals Unlimited.

Figura I 1. Micrografía electrónica de barrido de pulmón donde se observa la estructura de los alvéolos (1).

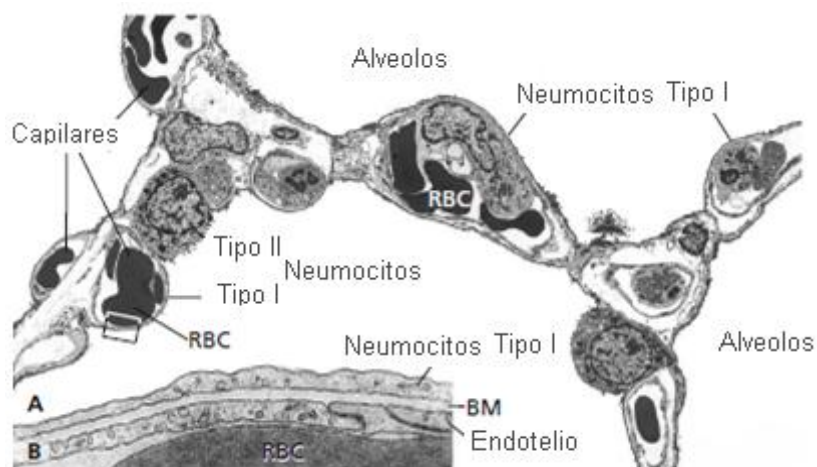


Figura I 2. Micrografía electrónica de transmisión donde se observan los componentes principales de los alvéolos; RBC (Red Blood Cells), BM (Membrana basal) (3).

Matriz Extracelular

Los tejidos no están integrados únicamente por células, sino que una gran parte de éstos está compuesta por una red de macromoléculas que forman la matriz extracelular (MEC)(4), la cual participa de manera importante en la determinación de la arquitectura específica de cada órgano y tejido. La MEC se compone de una gran variedad de elementos que no solo garantizan la arquitectura del tejido sino que tienen un papel fundamental en las funciones biológicas de los diferentes órganos. Los componentes de la MEC incluyen las proteínas estructurales (colágenas) y otros tipos de proteínas de adhesión como fibronectina, elastina, laminina y proteoglicanos. Las colágenas tipo I, III y VI están asociadas principalmente con los depósitos de fibras de los órganos, y la colágena tipo IV y la laminina forman la lámina basal de los epitelios (5). Todos estos componentes interactúan entre sí, formando la estructura tridimensional en la cual las células están inmersas. Los componentes de la MEC son secretados de manera local y forman esta red organizada, que se mantiene en una asociación cercana con las células que las producen (5). En la mayoría de los tejidos la MEC es producida por fibroblastos. La matriz extracelular además de proveer una estructura de soporte para las células y los órganos actúa como un almacén de reserva para una gran cantidad de moléculas como citocinas y factores de crecimiento que regulan procesos celulares complejos como migración, proliferación, apoptosis entre otros. La liberación y activación controlada de éstas citocinas y factores de crecimiento, dentro de los cuales se encuentran la familia de TGF- β , y por otro lado la participación de las integrinas que se encuentran

embebidas en la membrana plasmática garantizan la comunicación entre los componentes de la MEC y el ambiente intracelular (5,6). La MEC además orquesta de manera activa los pasos fundamentales en los programas de cicatrización de heridas y regeneración. (5).

Metaloproteasas de Matriz

La matriz extracelular está permanentemente en remodelación, lo que significa una constante síntesis y degradación de las moléculas que la componen, esta degradación se lleva a cabo por enzimas proteolíticas específicas como las metaloproteasas de matriz (MMPs). El proceso de degradación de la MEC tiene gran importancia en diversos procesos como el desarrollo de los organismos, en la morfogénesis y en la reparación de tejidos, y está regulada finamente en estos procesos, sin embargo el desequilibrio en la síntesis y degradación en conjunto con alteraciones celulares se asocia con diferentes procesos patológicos. La familia de las MMPs en el humano está constituida por 23 miembros que en su mayoría son enzimas que se secretan al espacio extracelular aunque algunas se anclan a la membrana celular y se denominan metaloproteasas tipo membrana (MT-MMPs por sus siglas en inglés). Recientemente, se ha documentado que algunas MMPs como la MMP-1, MMP-2 y MMP-11 también pueden presentarse al interior celular y pueden actuar sobre proteínas intracelulares (7).

Dominios estructurales de las MMPs

Todas las MMPs con excepción de la MMP-23 tienen al menos los dominios conservados llamados prodominio y dominio catalítico. El prodominio de una MMP está compuesto por alrededor de 80 aminoácidos, es el responsable de la latencia de la enzima y en este estado se denomina zimógeno, esto se logra debido a que

en este prodominio se encuentra un residuo de cisteína que forma un enlace con el ion Zinc presente en el dominio catalítico. Un dominio catalítico típico de una MMP contiene entre 160 y 170 residuos, incluyendo los sitios de unión a los iones metálicos de zinc y calcio. El péptido señal es otro dominio que marca a la proteína para su envío hacia el retículo endoplasmico. La especificidad a sustratos está modulada por un dominio conocido como tipo hemopexina, en el cual también se unen los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). El dominio tipo hemopexina y el catalítico se unen por una región conocida como bisagra que se compone por alrededor de 75 residuos. Existen otros dominios, como el anclaje de glicosilfosfatidilinositol, que une a las proteínas a la superficie externa de la membrana plasmática (MMP-17 y -25), el dominio de unión a gelatina que está presente en las dos gelatinasas (MMP-2 y -9) que contiene tres módulos de tipo fibronectina. Por último algunas MMPs tienen un sitio de unión a furina entre el dominio catalítico y propéptido, que permite la activación de proenzimas por las proteasas de serina tipo furina, como la MMP-11 y algunas MT-MMP (figura I3) (2,8-9).

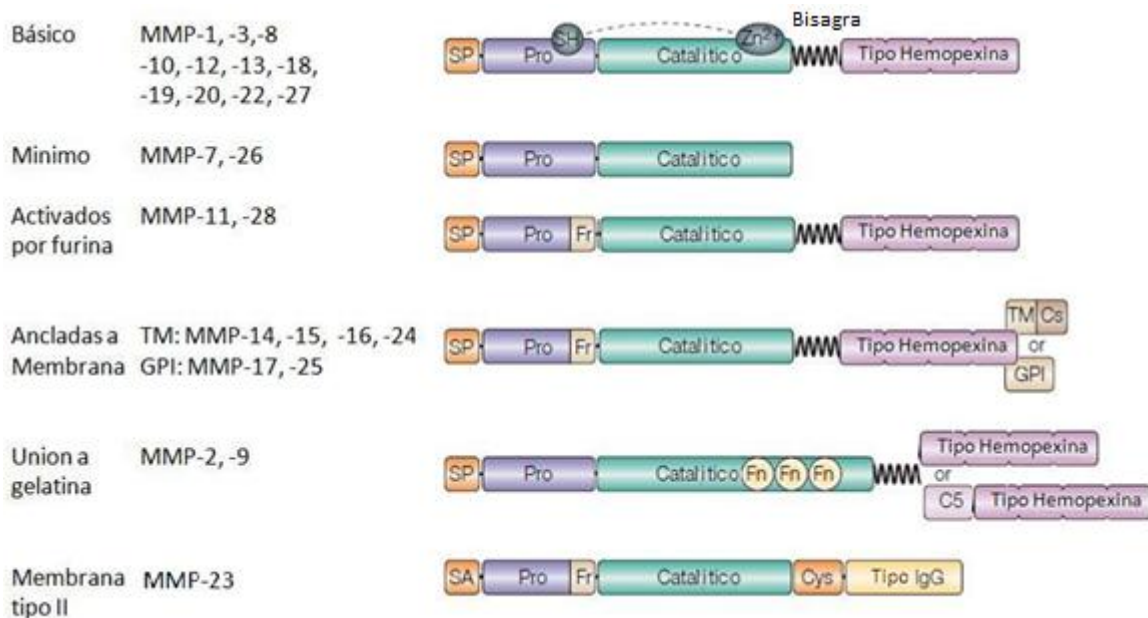


Figura I 3.- Dominios estructurales de la familia de MMPs. TM, Dominio transmembranal; GPI, anclaje Glicofosfatidilinositol; SA, Señal de anclaje amino-terminal; C5, dominio como colágena tipo V; Cs, Citosolico; Cys, Arreglo de cisteína; Fn, repeticiones de fibronectina; Fr, sitio de escisión de Furina; Pro, prodomino; SH, Grupo thiol; SP, péptido señal; Zn, zinc. (Modificada de ref. 8)

La familia de las MMPs se ha clasificado atendiendo a sus características funcionales y estructurales en 6 subgrupos diferentes, aunque cercanamente relacionados, que tienen características propias pero que se sobrelapan en cuanto a su especificidad de sustratos. Esta clasificación considera a las colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisinas y MMPs tipo membrana.

Tabla I. Una clasificación de MMPs basada en afinidad de sustratos (10-17).

Grupo	Miembros	Sustrato
Colagenasas	Colagenasa-1,-2,-3 y -4 (MMP-1, -8, -13 y 18)	Colágenas intersticiales tipo I, II y III

Gelatinasas	Gelatinasas A y B (MMP-2 y -9)	Gelatina, Colágena tipo IV y laminina. MMP-9 se expresa de manera constitutiva en neutrófilos.
Matrilisinas	Matrilisina-1 (MMP-7) y matrilisina-2 (MMP-26)	Componentes de MEC como colágena tipo IV, laminina y entactina, además la MMP-7 actúa sobre pro TNF- α y e-Caderina.
Estromelisinias	Estromelisina-1,-2 y -3 (MMP-3, -10 y -11, respectivamente)	MMP-3 y -10 degradan proteoglicanos, fibronectina, laminina, caseína, gelatina y colágenas tipo IV, IX y X. La MMP-3 puede activar algunas de las proenzimas de MMP's.
Metalo proteinasas asociadas a membrana (MT-MMP's)	MMP-14, -15, -16 y -24, dos se anclan por glicosilfosfatidilinositol (GPI, MMP-17 y MMP-25)	Activadores de pro-MMP-2, estas enzimas pueden degradar algunas moléculas de MEC, La MT1-MMP tiene actividad sobre colágena tipo I, II y III.
Otras MMP's	<p>Metaloelastasa MMP-12,</p> <p>MMP-19</p> <p>Enamelisina (MMP-20)</p> <p>MMP-22</p> <p>MMP-23</p> <p>MMP-28 o epilisina.</p>	<p>Expresada en macrófagos, degrada elastina y actúa sobre componentes de membranas basales.</p> <p>Puede hidrolizar colagena tipo IV, gelatina, tenascina, laminina, nidógeno y agregán.</p> <p>Amelogenina, localizada principalmente en esmalte dental.</p> <p>In vitro tiene actividad sobre gelatina y caseína</p> <p>Expresada en tejido reproductivo.</p> <p>Expresada principalmente en queratinocitos.</p>

Existen otras clasificaciones más, basadas en los dominios estructurales como las que se muestran en la figura I 3.

Fibrosis Pulmonar Idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica y progresiva del parénquima pulmonar de etiología desconocida y actualmente no tiene tratamiento, se caracteriza principalmente por la activación y proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y la acumulación exagerada de matriz extracelular lo que conlleva a una desorganización de la arquitectura pulmonar que interfiere con la función del órgano y termina siendo letal (18-21). Afecta predominantemente a individuos mayores de 50 años, es irreversible y habitualmente letal en un plazo corto de tiempo (19-29) con una supervivencia media de entre 3 y 5 años después del diagnóstico (21-22). Se ha reportado una mayor incidencia de hombres que mujeres con FPI, la edad de incidencia se encuentra entre los 40 y los 70 años, y dos terceras partes de los pacientes son mayores de 60 años (23).

Existen predictores clínicos de un peor resultado en los cuales se incluye la disnea progresiva, desaturación de oxígeno, la presencia y extensión espacios aéreos bordeados por epitelio bronquiolar a menudo llenos de mucosidad y un número variable de células inflamatorias, estas estructuras son conocidas como “panales de abeja” observados en tomografías computarizadas de alta resolución (TCAR) además de la presencia de hipertensión pulmonar (24).

Una de las características principales de la FPI es la presencia de los llamados focos de fibroblastos, los cuales consisten en agregados celulares de fibroblastos-miofibroblastos, que se han asociado con las zonas de transición entre el tejido normal y el tejido fibrótico del pulmón y que son los principales productores de moléculas de matriz extracelular (MEC). Se ha observado que los fibroblastos son policlonales, sin embargo se desconoce el origen de estos pero

existen varias posibilidades: la diferenciación de fibroblastos locales, el reclutamiento de precursores circulantes como fibrocitos y el origen a partir de células epiteliales en una transdiferenciación; este proceso es conocido como transición epitelio-mesenquima (EMT, por sus siglas en inglés) (25).

Aunque la etiología de la FPI es desconocida, durante mucho tiempo se tuvo la idea de que la fibrosis se presentaba siempre por una vía inflamatoria, en la cual la persistencia de células inflamatorias en el tejido pulmonar, tanto en el intersticio como en los espacios alveolares era la causa del proceso de fibrosis. Sin embargo en 2001 se planteó la hipótesis que sugiere una vía no inflamatoria y que consiste en daños pequeños, focalizados y aislados en el epitelio que provocan un mecanismo patológico de reparación fibrótica, resultando en cicatrizaciones y en una reestructuración anormal e irreversible del tejido pulmonar (26). Estos daños provocan una activación aberrante de las células epiteliales alveolares (CEA), que tiene como consecuencia la migración, proliferación y activación de células mesenquimatosas además de la formación de focos de fibroblastos, llevando a la acumulación exagerada de componentes de MEC.

Existen factores de riesgo que se han asociado a la FPI como el fumar cigarrillos, la aspiración crónica de reflujo gastroesofágico, los factores ambientales, las infecciones y la predisposición genética. (23).

Diversos estudios han mostrado que el curso clínico de la enfermedad puede ser muy variable. La mayoría de los pacientes permanecen estables durante mucho tiempo o empeoran lentamente, considerados progresores lentos; otros fallecen poco tiempo después del diagnóstico mostrando una forma acelerada de la enfermedad, estos se denominan progresores rápidos; también

existen pacientes que progresan lento y de manera súbita los síntomas se intensifican lo que los lleva a una falla respiratoria y a la muerte, este en un fenotipo denominado FPI con exacerbación aguda. Por último y de importancia para este trabajo en un porcentaje de pacientes fumadores con FPI se detectan lesiones enfisematosas en los lóbulos superiores (observadas mediante TCAR), algunos de ellos desarrollan hipertensión arteriopulmonar severa y presentan una tasa de supervivencia menor que los pacientes con FPI sola, este es un fenotipo denominado fibrosis pulmonar combinada con enfisema (FPCE) (27).

Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica y Enfisema Pulmonar

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se caracteriza fisiológicamente por una reducción del flujo de aire a través del sistema respiratorio (28), la causa principal de esta enfermedad es fumar cigarrillos, pero existen otros factores de riesgo como son la exposición constante a polvo y humo, infecciones de sistema respiratorio frecuentes en la niñez, la exposición al humo de cigarro de segunda mano (fumadores pasivos) y algunas deficiencias genéticamente determinadas. Es una enfermedad que empeora progresivamente con el tiempo y se caracteriza por ser crónica con abundante expectoración mucosa, hipoxemia durante el ejercicio, además de una creciente pérdida de la habilidad para exhalar aire. Las dos enfermedades más comunes que se asocian con EPOC son bronquitis crónica y el enfisema pulmonar (1).

El enfisema pulmonar es una enfermedad fuertemente asociada al tabaquismo que se caracteriza patológicamente por la degradación excesiva del parénquima pulmonar además de apoptosis de células epiteliales y endoteliales alveolares lo que conduce a la pérdida irreversible de alvéolos pulmonares (29-

31). Entre los daños que se presentan se puede observar alvéolos hiperinflados que se pueden fusionar con otros alvéolos, como resultado de todos estos daños las paredes alveolares se reducen en extensión y se pierde el contacto con los vasos capilares que se encuentran asociados a los alvéolos lo que resulta en una pérdida de superficie de intercambio y oxigenación de la sangre, adicional a esto también existe una pérdida de elasticidad que provoca que el aire en los alvéolos no se intercambie por aire oxigenado, otro de los síntomas asociados al enfisema son la pérdida de peso y un incremento en la talla de pecho llamada tórax en tonel.

La hipótesis predominante en la generación de enfisema es un desbalance de proteasas-antiproteasas. El tejido pulmonar requiere de un delicado equilibrio en la actividad de proteasas-antiproteasas para mantener el correcto funcionamiento, trastornos en este balance pueden resultar en un incremento en la destrucción y una reparación inapropiada de los pulmones, lo que puede resultar en enfisema. Uno de los factores de riesgo genéticos para enfisema es la deficiencia de α -antitripsina, por otro lado un modelo animal con un ratón deficiente (knock out) de MMP-12 mostró resistencia al desarrollo de enfisema en un modelo de exposición al humo de cigarro (28), muchos estudios han mostrado correlación entre el grado de inflamación por macrófagos y neutrófilos y la gravedad de la obstrucción del flujo de aire (32).

Fibrosis Pulmonar Combinada con Enfisema

La combinación de fibrosis pulmonar con enfisema fue reportada por primera vez en 1974 por Auerbach (33), tras realizar un estudio microscópico de la

relación del hábito de fumar y la edad en los cambios en el parénquima pulmonar en muestras de autopsias de 1824 sujetos, describió que la presencia de fibrosis se incrementaba hasta 40 veces en fumadores de 2 o más paquetes de cigarrillos diarios.

Fue hasta los años 90's cuando comenzó a describirse clínicamente a pacientes con antecedentes de tabaquismo que presentaban áreas de fibrosis y enfisema y en 2005 se identificó como una nueva entidad clínica de fibrosis pulmonar idiopática combinada con enfisema (*FPCE*) en individuos fumadores de cigarrillos (34,35). La integración de la tomografía computarizada de alta resolución como una herramienta para el diagnóstico de enfermedades como la FPI ha permitido reconocer esta entidad, y es la herramienta primordial que permite confirmar su diagnóstico. En este síndrome coexisten lesiones enfisematosas en los lóbulos superiores y fibróticas en los lóbulos inferiores, de manera importante, los pacientes con FPCE desarrollan hipertensión arterial pulmonar severa y éste es un factor muy importante pues se ha visto que su presencia lleva a un curso clínico peor y tiene una tasa de supervivencia significativamente menor. En un estudio se observó que para los pacientes con FPCE que presentaban hipertensión pulmonar (HP) su probabilidad de supervivencia a 5 años era de 25% en comparación con 75% en los pacientes que no presentaron HP (36). A partir de su descripción en 1990 y con estudios-caso se han descrito como características de este síndrome una disnea significativa, volúmenes pulmonares normales o casi normales explicados por los efectos opuestos de la hiperinflación y la restricción (fibrosis) y una significativa reducción

de la capacidad de difusión: esta enfermedad se presenta principalmente en hombres fumadores (36-37).

Aunque la fibrosis pulmonar idiopática y el enfisema pulmonar tienen características clínicas y patológicas diferentes y se consideran enfermedades distintas, algunos hallazgos en modelos experimentales han sugerido que en relación a su patogénesis las enfermedades tienen algunas características comunes.

Por ejemplo se ha reportado que los ratones transgénicos que sobre-expresan el factor de crecimiento transformante α (TGF- α por sus siglas en inglés) desarrollan enfisema y fibrosis pulmonar independiente de inflamación durante la alveologénesis posnatal (38). Asimismo, los ratones transgénicos que sobre-expresan la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB por sus siglas en inglés) mostraron un fenotipo complejo que comprendía tanto aspectos de enfisema como de fibrosis pulmonar (39). Asimismo, los ratones transgénicos que sobre-expresan, bajo el promotor C de la proteína surfactante (SP-C), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) mueren al nacimiento o algunas semanas después con lesiones pulmonares muy severas. Los pocos que sobreviven muestran con la edad, espacios alveolares alargados característicos de enfisema pulmonar y engrosamiento de las paredes alveolares con la acumulación de fibroblastos que contienen desmina y fibras de colágena características de fibrosis pulmonar (40). A la fecha, los mecanismos responsables del desarrollo de enfisema en un subgrupo de pacientes con FPI se desconocen.

Objetivo

En este estudio se determinaron los niveles de una serie de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas, endotelina-1, una molécula involucrada en la hipertensión pulmonar, y la actividad de la metaloproteasa-9 en el lavado bronquioalveolar de pacientes con FPCE y pacientes con FPI pura. Para identificar cuales podrían estar implicadas en el desarrollo del fenotipo de FPCE.

Material y métodos

Muestras biológicas

Se trabajó con 11 muestras de Lavado Bronquio Alveolar (LBA) de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), 16 de Fibrosis Pulmonar combinada con Enfisema (FPCE) y 11 controles (C).

Los LBA fueron realizados con fines de diagnóstico en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas” y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del INER.

Los LBA se obtienen como se ha explicado previamente (23). En breve, se introdujeron 300 ml de solución salina estéril en alícuotas de 50 ml, y se extrae suavemente. Después de filtrar con gasa estéril, se cuantificó el volumen, el líquido obtenido se centrifugó a 250 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se guardó a -70°C hasta su uso. El botón celular se resuspendió en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos, (PBS por sus siglas en ingles) y una alícuota se utilizó para determinar el número total de células. Otras alícuotas se fijaron en carbowax, y se usaron para el conteo diferencial de células inflamatorias en laminillas teñidas con hematoxilina-eosina.

Determinación de proteína total

Alícuotas de 2 mL de LBA se concentraron a sequedad en un sistema de concentración Speed Vac^R Plus (SAVANT). Posteriormente, las muestras se resuspendieron en la décima parte del volumen inicial con agua desionizada (dde) La parte de las muestras que no fueron concentradas se mantuvieron a -70 °C.

La determinación de proteína se realizó con el ensayo de proteína Bio-Rad, el cual está basado en el método de Bradford. Se siguieron las recomendaciones del proveedor (Bio-Rad Protein Assay de Bio-Rad Laboratories USA), que consiste en que previo al ensayo se preparó el reactivo colorante con una dilución de una parte de Dye Reagent Concentrate con cuatro partes de agua dde, se agitó y filtró para remover partículas. Se preparó una curva estándar de albúmina de suero bovino (SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis MO. USA) con 5 concentraciones diferentes conocidas, 0.5, 1, 2, 4, y 8 $\mu\text{g/ml}$. Se agregaron 10 μL de cada estándar y muestra en pozos separados en una microplaca, se adicionaron 200 μl del colorante diluido y la muestra se mezcló utilizando un agitador de microplacas (MICROMIXER Mx2 de DAIGGER). Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Original Multiskan EX, Thermo Labsystems). Todas las muestras se midieron por duplicado.

Zimografía

Para medir la actividad enzimática de gelatinasas MMP-2 y MMP-9 se trabajó con un total de 6 muestras de LBA de pacientes con FPCE y 6 de FPI como se describe a continuación. Alícuotas de LBA que contenían 1.0 μg de proteína se analizaron por zimografía en geles de poliacrilamida SDS al 8.5 % que contienen gelatina (1mg/ml) como sustrato y 0.3 mg/ml de heparina. Se realizó la electroforesis en cámaras de electroforesis (Mini-PROTEAN® II Cell BIO-RAD). Después de la electroforesis, los geles se lavaron en una solución Tritón X-100 (SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis MO. USA) dos veces en agitación constante

por 15 minutos, se lavaron con abundante agua y se incubaron a 37°C en buffer TRIS/ glicina 100 mM pH 7.6, con CaCl₂ 10 mM y ZnCl₂ 50 nM toda la noche y posteriormente los geles se tiñeron con Azul brillante de Coomasie R250 y se destiñeron con una solución ácido acético/metanol. Se usaron como estándares de MMP-9 y MMP-2 sobrenadante de cultivos celulares de células de osteosarcoma (U2OS) estimuladas con PMA (phorbol 12-miristato 13-acetato) y de fibroblastos de cultivo primario, respectivamente.

Después se realizó un análisis densitométrico de la intensidad de las bandas de actividad de los zimogramas digitalizando las imágenes en el equipo molecular imager ® ChemiDoc XRS+ de Bio-rad y se utilizó un software de análisis de imágenes de BIO-RAD (Quantity One^R 1-D Analysis Software) el cual asigna valores a la intensidad de bandas en los geles de zimografía.

Immunohistoquímica

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica para detectar la presencia de MMP-9 en tejidos pulmonares, utilizando anticuerpo dirigido específicamente contra ésta molécula (Mouse anti-MMP-9 Monoclonal Antibody Chemicon^R International) con una concentración de 1:800 en secciones de tejido pulmonar embebidos en parafina de pacientes con FPI y FPCE. El método se describe brevemente a continuación; Secciones pulmonares se desparafinaron con xilol y rehidrataron con etanol de mayor a menor concentración hasta terminar con agua, posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% en metanol por 30 minutos. El desenmascaramiento del antígeno se realizó calentando las

muestras en amortiguador de citratos 10 mM pH 6.0, en un horno de microondas por 8 min. Los tejidos se trataron con suero total de borrego (CHEMICON Australia Pty. Ltd), durante 30 minutos, para bloquear sitios inespecíficos. Los tejidos se incubaron con anticuerpo contra MMP-9 toda la noche a 4°C y posteriormente se usó un segundo anticuerpo anti IgG biotilado seguido por estreptavidina conjugada a peroxidasa. Como sustrato se utilizó 3-amino-9-etil-carbazol en amortiguador de acetatos con H₂O₂ al 0.05% (41).

Ensayos Bio-plex

Para determinar la concentración de MMP's y citocinas en LBA de los grupos de estudio, se tomaron alícuotas 10 veces concentradas de LBA y se analizaron en placas del sistema de inmunoensayo Bioplex 200 (BioRad) que utiliza esferas de poliestireno acopladas covalentemente a anticuerpos dirigidos contra las moléculas de interés. Los ensayos se realizaron siguiendo el instructivo del proveedor. Brevemente, los pozos de la placa se humedecieron, después se agregaron las esferas, los estándares y muestras y se incubaron en agitación utilizando un agitador de microplacas a máxima velocidad (MICROMIXER Mx2 de DAIGGER) durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó el anticuerpo de detección y se incubó nuevamente 30 minutos en agitación constante a máxima velocidad, una vez pasado este tiempo se agregó estreptavidina-ficoeritrina, se incubó 10 minutos; entre cada incubación se realizó un lavado de la placa con buffer suministrado por el proveedor. Por último se resuspendió para leer en el equipo Bio-plex Suspension Array System. Los datos fueron analizados con el software Bio-Plex Manager™ Versión 4.1 el cual permite

el manejo de los resultados y presenta las concentraciones de cada una de las moléculas en cada muestra.

Se realizaron dos ensayos independientes, el primero fue para detectar MMP's (Fluorokine^R MAP MMP Base Kit R&D SYSTEMS Minneapolis, MN. USA) se detectaron simultáneamente MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP12 y MMP-13 (Human MMP-1 Fluorokine MAP, Human MMP-2 Fluorokine MAP, Human MMP-3 Fluorokine MAP, Human MMP-7 Fluorokine MAP, Human MMP-9 Fluorokine MAP, Human MMP-12 Fluorokine MAP, Human MMP-13 Fluorokine MAP, R&D SYSTEMS Minneapolis, MN. USA) y en un segundo ensayo se detectaron simultáneamente IL-1 β , IL-5, IL-8, PDGF-bb, y TNF- α (Bio-Plex ProTM Cytokine Assay, 5Plex Group 1 Bio-Rad Laboratories, Inc. U.S.A)

ELISA

Adicionalmente, se midió por ELISA (inmunoensayo enzimático cuantitativo) ET-1, TGF- β y TGF- α en tres ensayos de manera independiente. ET-1 (Human Endothelin-1 Immunoassay R&D SYSTEM Minneapolis, MN. USA), TGF- β (Quantikine[®] Human TGF- β Immunoassay R&D SYSTEM Minneapolis, MN. USA) y TGF- α (Quantikine[®] Human TGF- α Immunoassay R&D SYSTEM Minneapolis, MN. USA)

El procedimiento para determinar la concentración de ET-1 se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor (Human Endothelin-1 Immunoassay R&D SYSTEM Minneapolis, MN. USA). Primero, se agregaron 100 μ L de conjugado (peroxidasa de rábano "HRP" por sus siglas en inglés) a cada pozo, se agregaron

los estándares, control y muestras 10 veces concentradas por duplicado. Se incubó a temperatura ambiente (T.A.) durante 1 hora, se decantó el contenido de cada pozo y se lavó 6 veces con buffer de lavado, después se agregaron 100 μ L de sustrato (tetrametilbenzidina) y se incubó durante 30 minutos T.A., para finalizar se agregaron 100 μ L de solución de paro (solución acida) y se determinó la densidad óptica en el lector de microplacas antes citado, en 450 nm y haciendo una corrección a 620nm.

Para determinar la concentración de TGF- α se siguieron las instrucciones del proveedor (Quantikine® Human TGF- α Immunoassay R&D SYSTEM Minneapolis, MN. USA) las cuales se describen brevemente a continuación. Primero, se agregaron 100 μ L del diluyente de ensayo RD1W a cada pozo, se agregaron 50 μ L de estándar, control o muestras 10 veces concentradas, por duplicado, cubriendo la placa con una tira adhesiva incluida en el kit, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, después de la incubación los pozos se aspiraron y lavaron con buffer de lavado, repitiendo el proceso un total de 4 veces, después de retirar completamente el líquido del último lavado se agregaron 200 μ L del conjugado de TGF- α (anticuerpo policlonal de chivo contra TGF- α conjugado a HRP) y se incubó por 2 horas T.A., se repitió el paso de lavado y aspirado cuatro veces, se agregaron 200 μ L de la solución sustrato (Peróxido de hidrogeno y tetrametilbenzidina como cromógeno) y se incubó por 30 minutos T.A. protegiendo de la luz, pasado el tiempo de incubación se agregan 50 μ L de solución de paro (Acido sulfúrico 2N) y se determinó la densidad óptica en lector de microplacas a 450 nm. Haciendo una corrección a 540 nm.

Para la determinación de TGF- β se siguieron las instrucciones del proveedor (Quantikine® Human TGF- β Immunoassay R&D SYSTEM Minneapolis, MN. USA) como se describe brevemente a continuación. Primero se activó el TGF- β latente de las muestras, ya que el kit está diseñado para detectar el TGF- β activo. A 100 μ L de muestra concentrada 10 veces se le agregaron 20 μ L de HCl 1N, se mezcló y se incubó a T.A. 10 minutos, después se neutralizó el ácido de las muestras adicionando 20 μ L de 1.2 N NaOH/0.5 N HEPES. Después de esta activación las muestras se utilizaron para el ensayo que se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, a cada pozo se agregaron 50 μ L del diluyente de ensayo RD1-21, y 50 μ L de estándar, control o muestras activadas en el paso previo, se cubrieron con la cinta adhesiva y se mezclaron en un agitador de microplacas (MICROMIXER Mx2 de DAIGGER) se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente, terminado el tiempo de incubación se aspiraron los pozos y se lavaron 4 veces con buffer de lavado, después del último lavado se retiró completamente el buffer de lavado y se agregaron 100 μ L de conjugado de TGF- β (Anticuerpo policlonal contra TGF- β conjugado con HRP) a cada pozo, se cubrieron con una nueva cinta adhesiva y se incubó durante 2 horas a T.A. después de la incubación se repitió el proceso de lavado y se agregaron 100 μ L de solución sustrato (peróxido de hidrogeno con tetrametilbenzidina como cromógeno), incubando durante 30 minutos a T.A. y protegiendo de la luz, después se agregaron 100 mL de solución de paro (Solución acida hidroclicórica) se agito suavemente y se determinó la densidad óptica utilizando un lector de

microplacas (Original Multiskan EX de Thermo Labsystems) a 450 nm. Haciendo una corrección a 540 nm

Análisis Estadísticos

Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el paquete IBM SPSS Statistics 19 e INERSTAT-a v1.3. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante una prueba de Tukey. SE consideró como valor significativo una $p < 0.05$.

Resultados

Determinación de proteínas

Después de concentrar 10 veces cada una de las muestras en un sistema de concentración (Speed Vac Plus SAVANT) se realizó la determinación de proteína total con el método de Bradford, y a continuación se presenta una gráfica (Figura1) que representa la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína total.

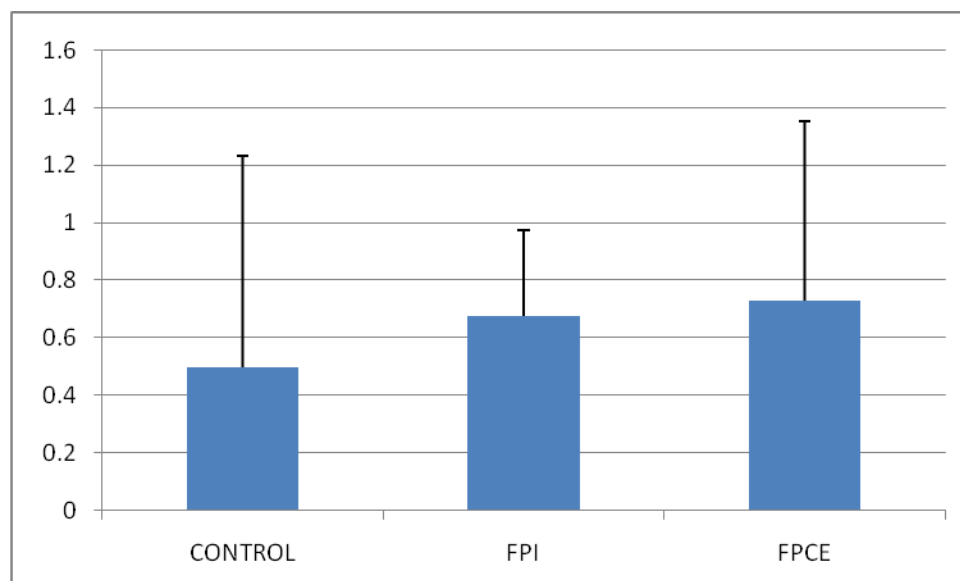


Figura 1. Promedio de la concentración de proteína $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada grupo después de concentrar 10 veces.

CONTEO CELULAR DIFERENCIAL

Se cuantificó el porcentaje de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos presentes en LBA de 10 pacientes con FPI, 15 con FPCE y 10 controles sanos. Como se muestra en la figura 2 no hubo diferencias significativas en el porcentaje de los diferentes tipos celulares en las muestra de LBA entre ninguno de los grupos.

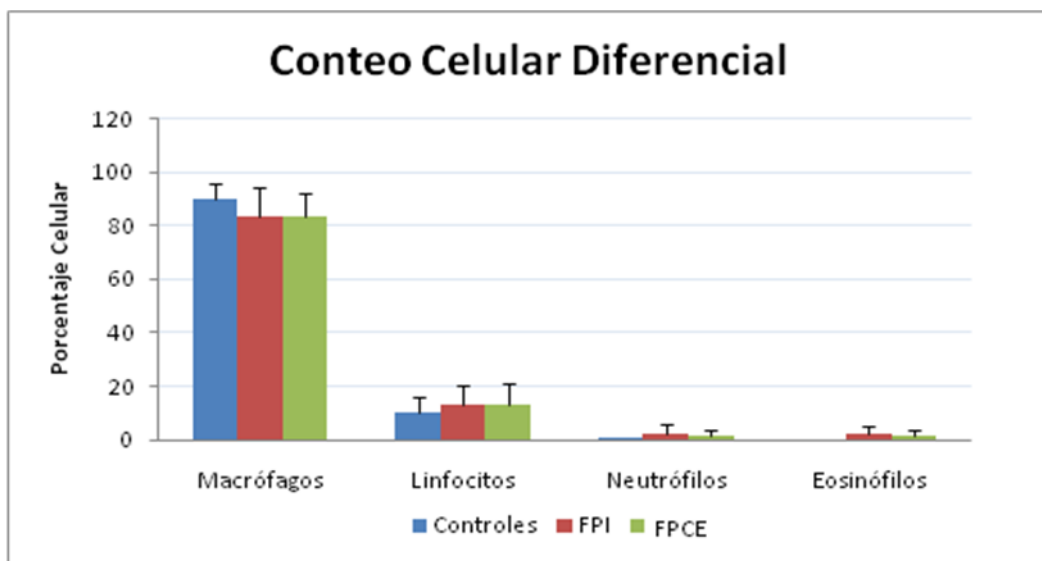


Figura 2. Conteo celular diferencial de LBA

ANÁLISIS POR ZIMOGRAFÍA EN GELATINA DE MMP-2 y MMP-9 EN LBA

Para determinar la presencia de MMP-2 y MMP-9 se realizaron zimografías con sustrato de gelatina, en donde se colocaron en los geles de poliacrilamida 1 μ g de proteína total por carril. En la figura 3 se ejemplifican dos geles representativos que incluyeron cada uno, tres muestras de FPI, tres de FPCE, y un control. Como se observa en las figuras 3a y 3b las muestras del grupo de FPCE presentaron una mayor intensidad de la banda de actividad de proMMP-9 y

de MMP-9 en comparación con las muestras de FPI mientras que en las muestras control no se detectaron. Por lo que respecta a la MMP-2 a la concentración de proteína utilizada en este experimento no se observaron diferencias entre las muestras de FPI y FPCE y no se detectó en los lavados control.

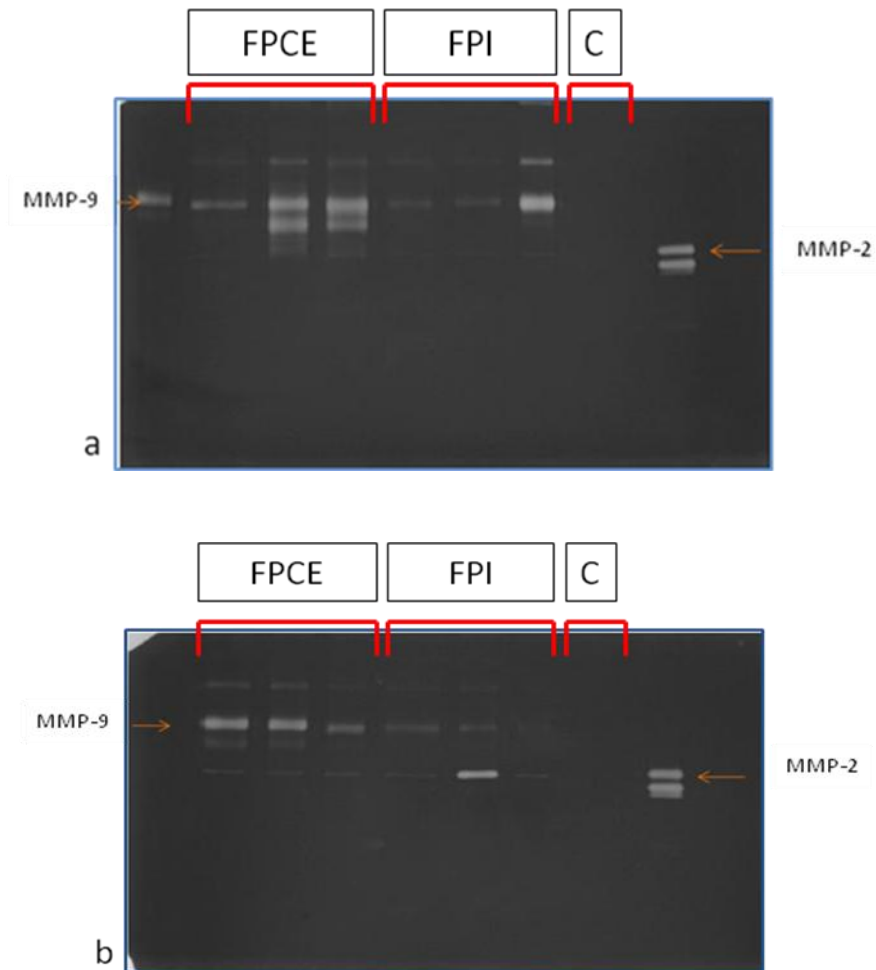


Figura 3. Zimografías con gelatina de LBA de muestras de FPCE, FPI y control. Las muestras de FPCE presentan una mayor actividad gelatinolítica de MMP-9 en comparación con las muestras de FPI.

El análisis densitométrico de las bandas de actividad se realizó utilizando el software de análisis de imágenes de Quantity One^R 1-D Analysis Software, el cual

asigna valores a la intensidad de bandas en los geles de zimografía. En la figura 4 se muestra el resultado del promedio de ambos geles donde FPCE es significativamente mayor que FPI ($8095.06683 \pm 3797.24331$ vs 1388.622 ± 393.215013 respectivamente $p < 0.01$).

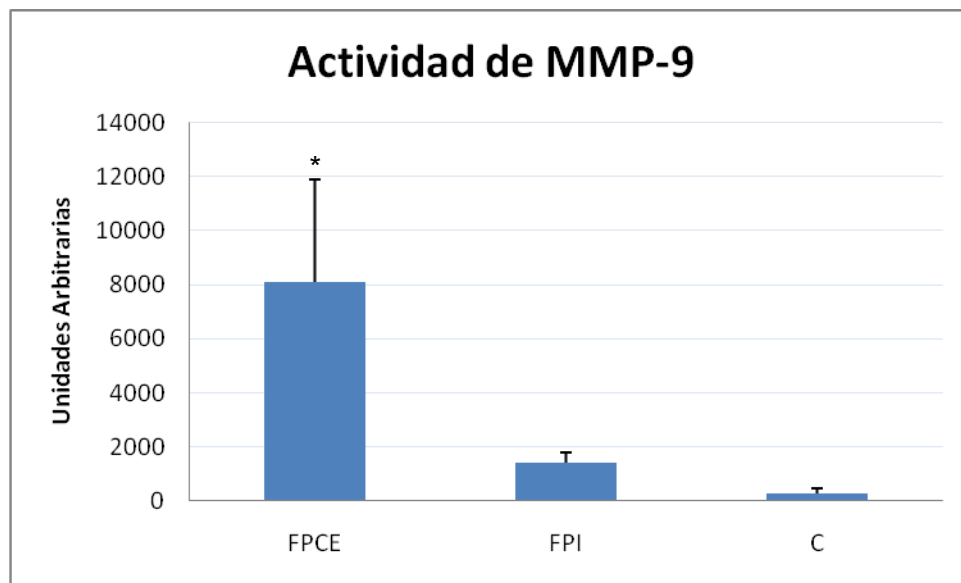


Figura 4. Densitometría de las bandas de actividad de MMP-9 geles 2a y 2b, *($p < 0.01$).

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA SIMULTÁNEA DE MMPs EN LBA

Con objeto de cuantificar la MMP-9 y otras MMPs se realizó un análisis de MMP's en bio-plex (BIO-RAD), para cuantificar de manera simultánea la concentración de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12 y MMP-13. La cuantificación se hizo con muestras de 3 controles, 6 FPI y 7 FPCE, por duplicado y en dos diferentes concentraciones 1x y 10x. Para todas las moléculas excepto MMP-9 las muestras sin concentrar no presentaron valores cuantificables, por lo que los datos se analizaron en las muestras concentradas.

Como se observa en la figura 5 este método corroboró los hallazgos del zimograma ya que la concentración de MMP-9 en las muestras de LBA de FPCE es significativamente mayor que las de FPI y de las muestras control (5180.7 ± 1741 vs 2662.5 ± 718 vs 0 pg/mL respectivamente $p < 0.05$).

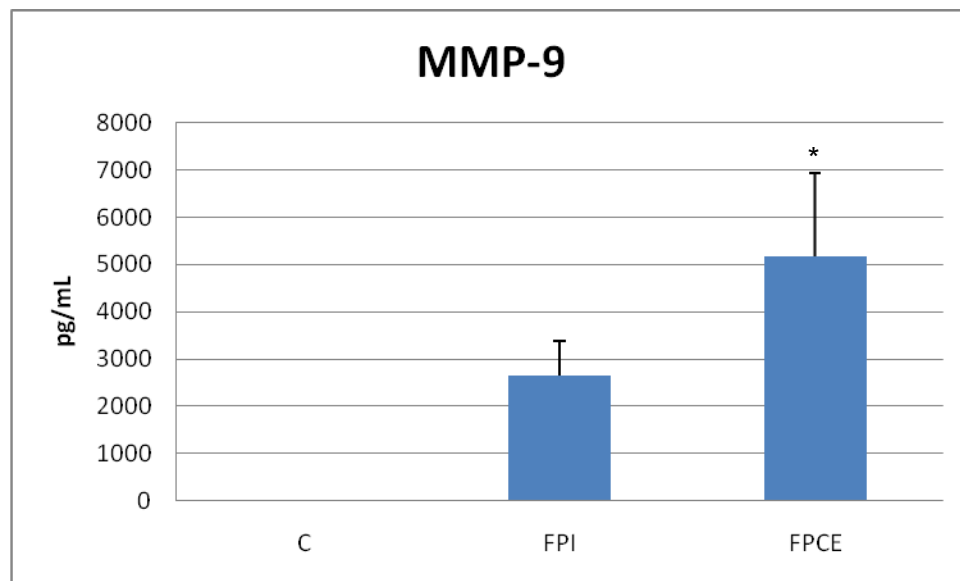


Figura 5. Concentración de MMP-9 en LBA . * $p < 0.05$

En relación con la MMP-2 los grupos no presentaron diferencias significativas con valores promedio de 55.67 ± 136.38 vs. 247.68 ± 253.35 pg/mL para FPI y FPCE respectivamente (fig. 6).

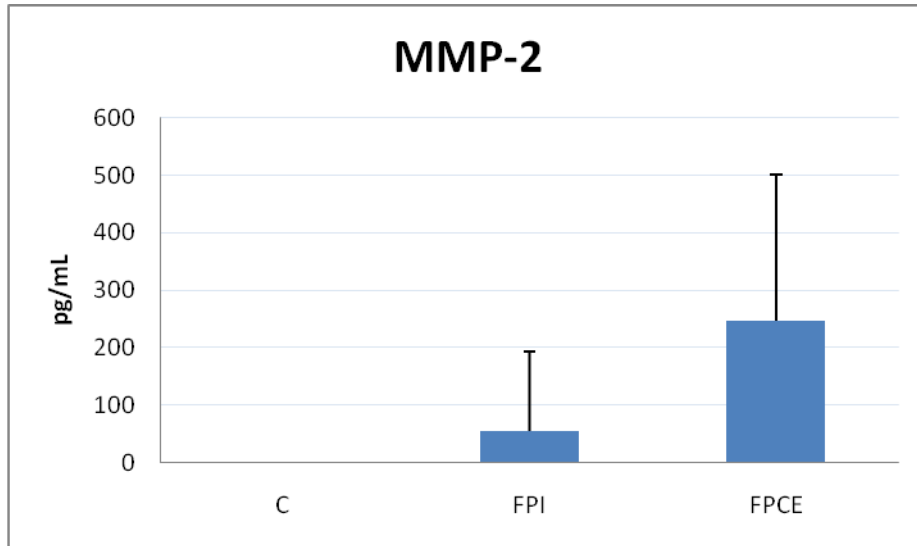


Figura 6. Concentración de MMP-2 en LBA.

La concentración de MMP-1 no resultó con diferencias significativas entre los grupos con valores promedio de 5.55 ± 12.41 vs. 5.78 ± 12.93 para FPI y FPCE y 0 pg/mL en control respectivamente (fig. 7).

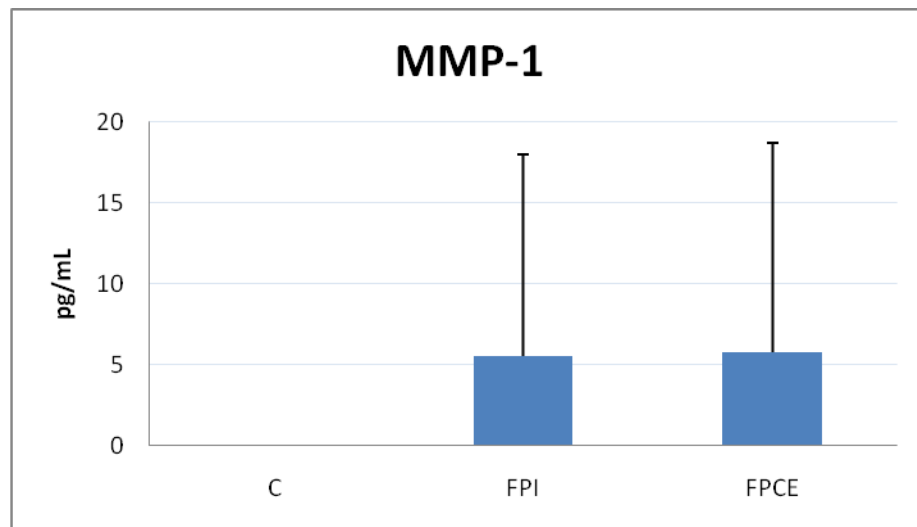


Figura 7. Concentración de MMP-1 en LBA.

En cuanto a la MMP-7 las concentraciones no presentaron diferencias significativas entre los grupos ni con el control, presentando promedios de 630.42

± 467.11 vs 930.81 ± 612.75 pg/mL para FPI y FPCE y 189.52 ± 268.03 en el control (Fig. 8).

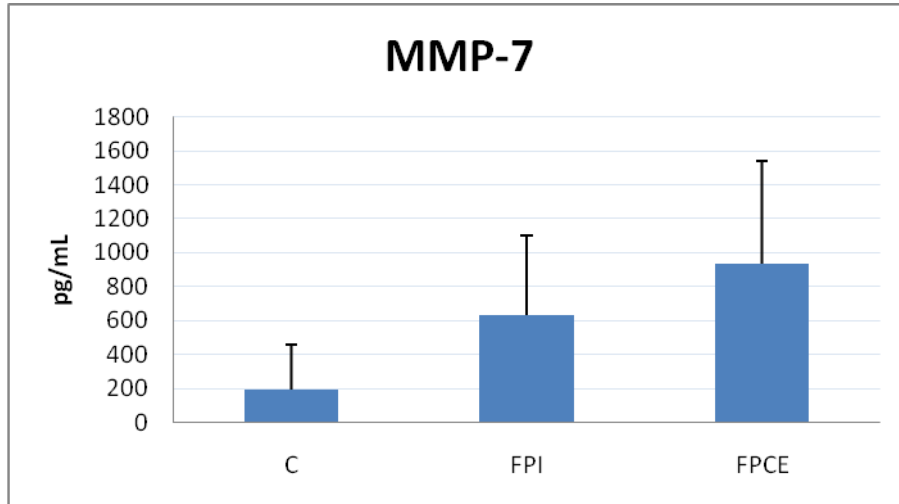


Figura 8. Concentración de MMP-7 en LBA.

La concentración de MMP-12 no resultó con diferencias significativas entre los grupos con valores promedio de 28.12 ± 43.68 Vs. 26.22 ± 58.64 para FPI y FPCE respectivamente (fig. 9).

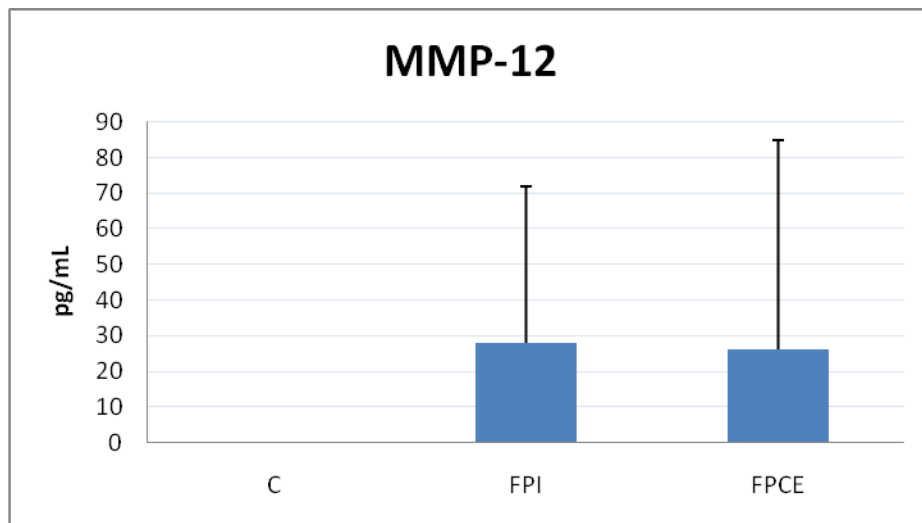


Figura 9. Concentración de MMP-12 en LBA

Para MMP-3 y MMP-13 no se detectó la concentración de estas enzimas en ninguno de los grupos del estudio.

INMUNOLOCALIZACIÓN DE MMP-9 EN TEJIDO PULMONAR

En virtud de que se encontraron diferencias en la actividad de MMP-9 entre los grupos de FPCE y FPI observada por zimografías, se realizó la localización celular de MMP-9 por inmunohistoquímica, en tejidos de 3 pacientes con FPI y 3 con FPCE.

La enzima inmunorreactiva se observó en células epiteliales (fig. 10A y C), focos de fibroblastos (fig. 10D) en ambos grupos y de manera diferencial en tejidos de FPCE se presentó en neutrófilos, estos principalmente asociados a vasos sanguíneos (10B).

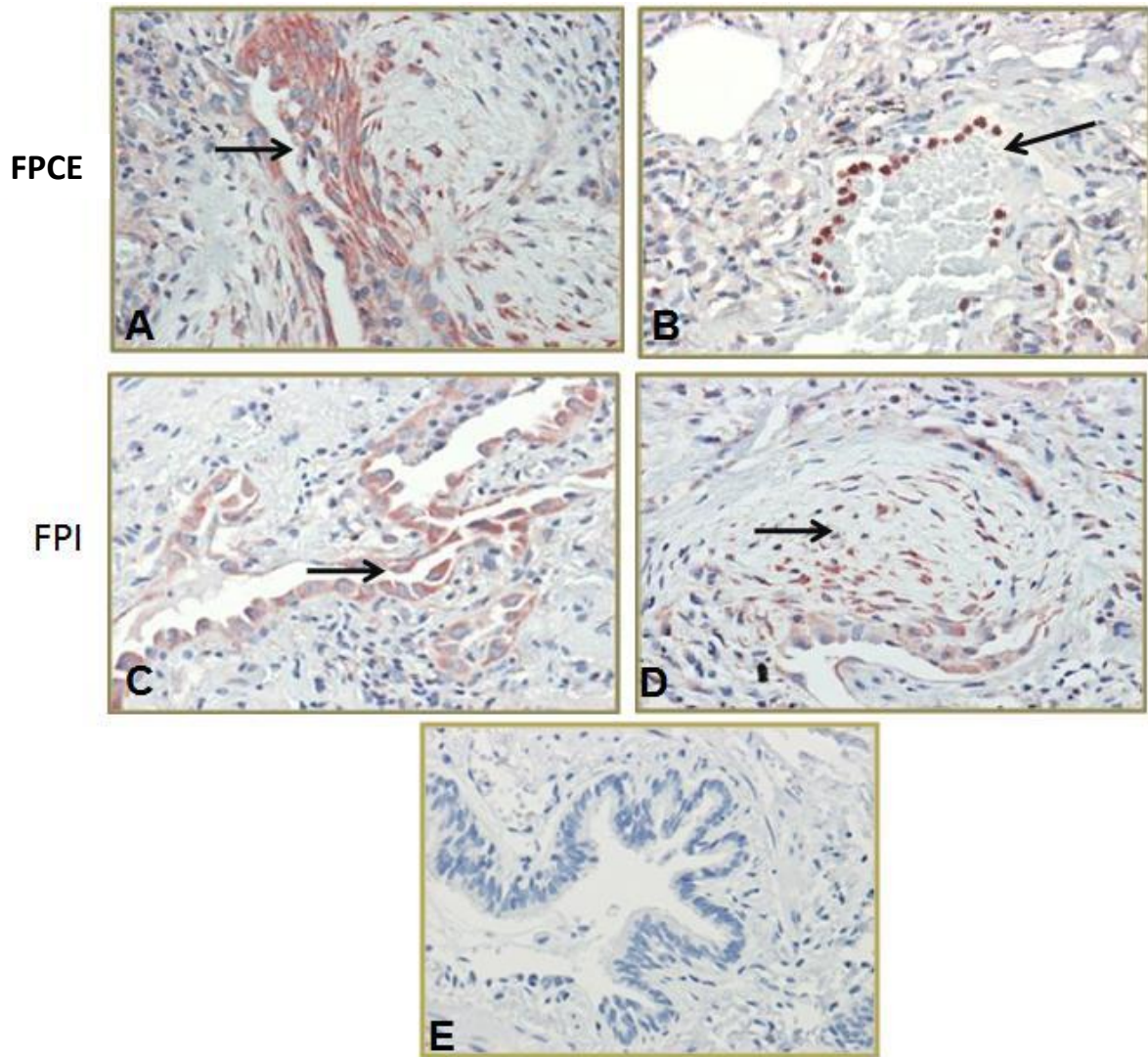


Figura 10: Inmunolocalización de MMP-9 en tejido pulmonar de pacientes con FPI y FPCE magnificación 40X. La enzima inmunorreactiva se observó en células epiteliales (flecha en A y C) y focos de fibroblastos (D) en muestras de ambos grupos y en los tejidos de FPCE se observó la enzima en neutrófilos (B) asociados a vasos sanguíneos. E: Control Negativo

ANÁLISIS CUANTITATIVO SIMULTÁNEO DE CITOCINAS EN LBA

Se realizó un ensayo de medición simultánea en Bio-Plex (Bio-Rad) para determinar la concentración de IL-1 β , IL-5, IL-8, PDGF-b, y TNF- α en el LBA de 8 pacientes con FPI, 12 CON FPCE, y 10 controles.

Como se observa en la figura 11 la concentración de IL-8 en las muestras de LBA de FPCE es significativamente mayor que las de FPI y de las muestras control (69.68 ± 58.52 vs. 161.04 ± 116.16 vs. 14.8 ± 6.74 pg/mL respectivamente $p < 0.05$).

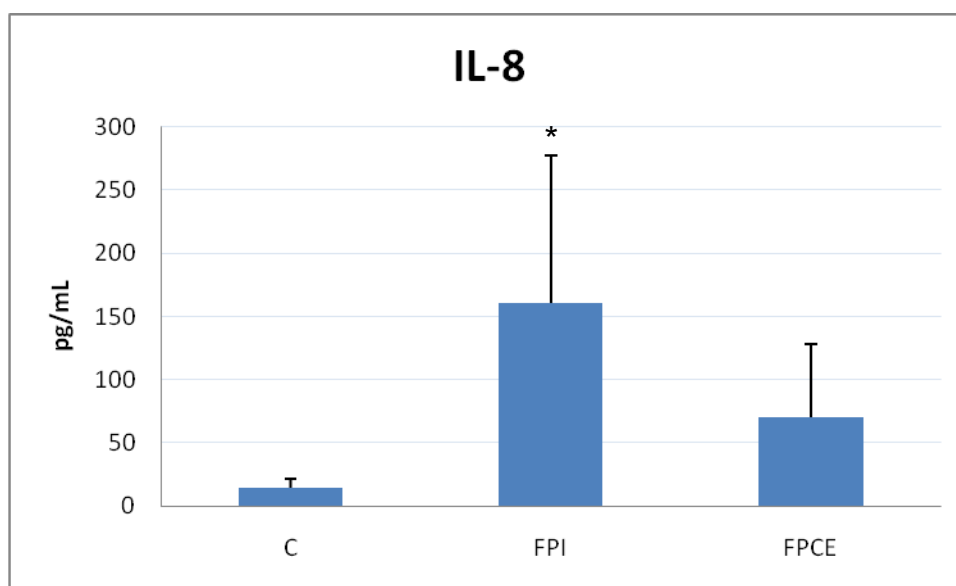


Figura 11. Concentración de IL-8 en LBA * $p < 0.05$

Por lo que se refiere a la IL1- β los grupos no presentaron diferencias significativas resultando con valores promedio de 1.60 ± 1.74 vs. 1.13 ± 1.34 pg/mL para FPI y FPCE respectivamente (fig. 12).

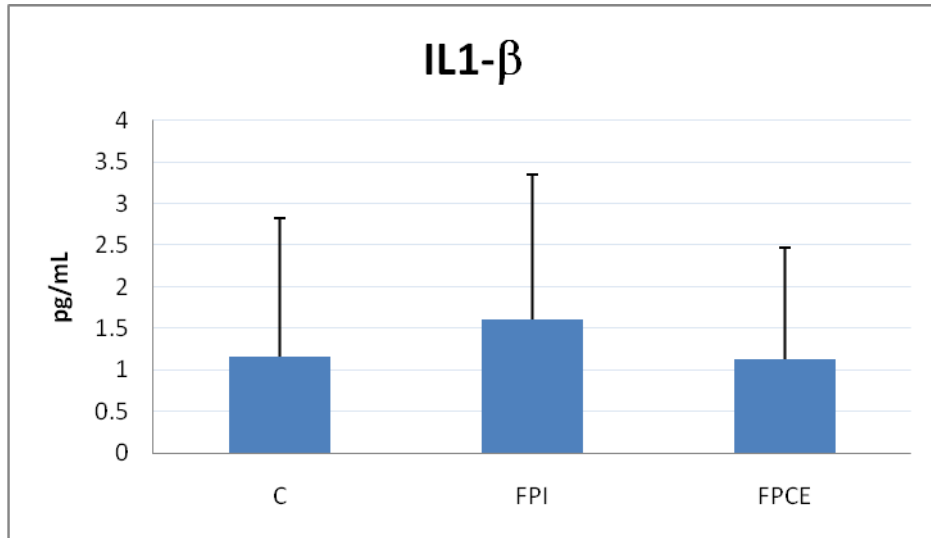


Figura 12. Concentración de IL1-β en LBA

La concentración de IL-5 no resultó con diferencias significativas entre los grupos con valores promedio de 0.42 ± 0.43 vs. 0.45 ± 0.40 pg/mL para FPI y FPCE respectivamente y 0 en control (fig. 13).

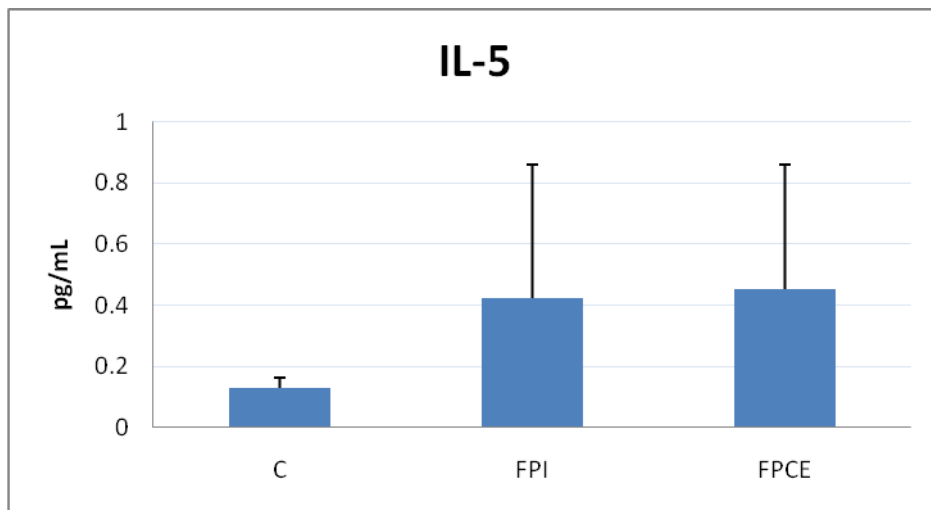


Figura 13, Concentración de IL-5 en LBA

La concentración de PDGF-B no resultó con diferencias significativas entre los grupos, presentando promedios de 47.8 ± 24.81 vs. 60.97 ± 36.46 vs. 28 ± 32.31 pg/mL para FPI, FPCE y control respectivamente (Fig. 14).

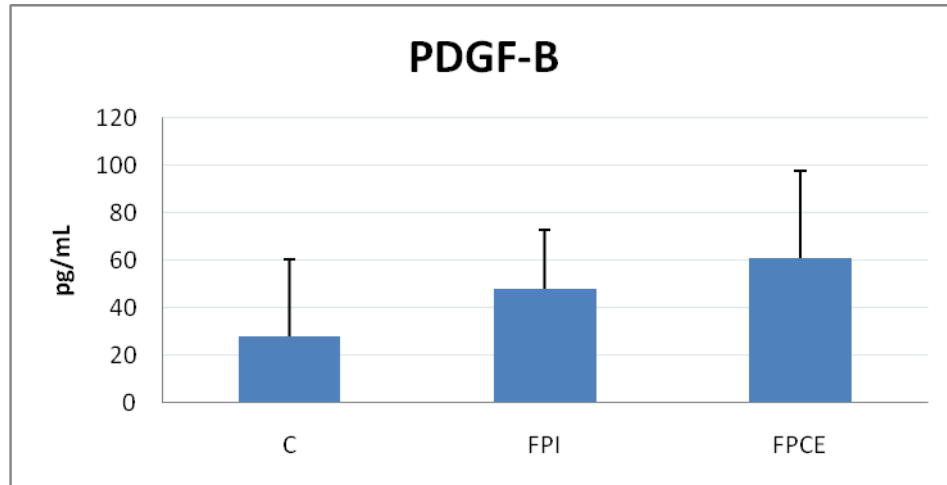


Figura 14. Concentración de PDGF-B en LBA

En cuanto a TNF- α los grupos no presentaron diferencias significativas con concentraciones de 0.69 ± 1.7 vs. 0.04 ± 0.11 vs 0.33 ± 0.5 pg/mL para FPI, FPCE y controles respectivamente (Fig 15).

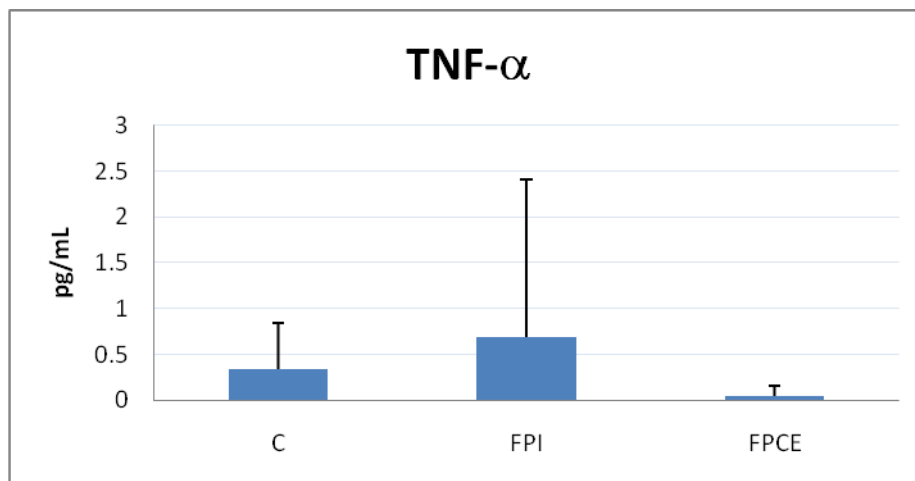


Figura 15. Concentración de TNF- α en LBA

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACION DE ET-1, TGF- β y TGF- α EN LBA

Se realizaron análisis inmunoenzimáticos (ELISA) para detectar de manera independiente los niveles de ET-1, TGF- β y TGF- α .

Los niveles detectados de ET-1 no presentaron diferencias significativas entre los pacientes con FPI y FPCE, los cuales presentaron en promedio una concentración significativamente menor que el control (0.24 ± 0.24 vs 0.23 ± 0.12 vs. 0.74 ± 0.38 para FPI, FPCE y Control respectivamente, $p < 0.01$).

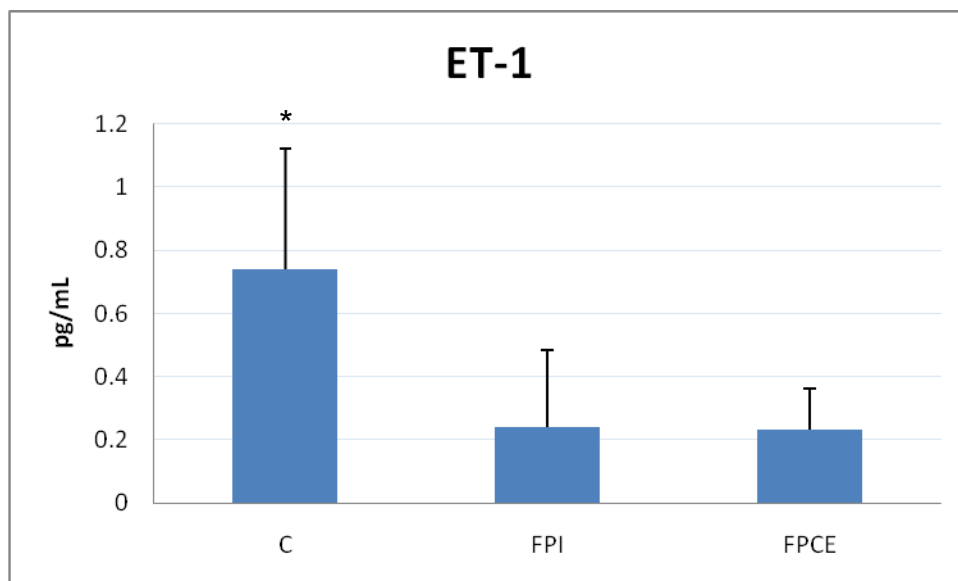


Figura 16. Concentración de ET-1 en LBA * $p < 0.01$

Otro ensayo de ELISA se realizó para determinar la concentración total de TGF- β en los sobrenadantes LBA de FPI, FPCE y controles sanos. Las muestras de FPCE resultaron con una concentración mayor significativamente en comparación con FPI (20.34 ± 7.46 vs. 11.6 ± 3.08 pg/mL, respectivamente, $p < 0.05$) (Fig. 17).

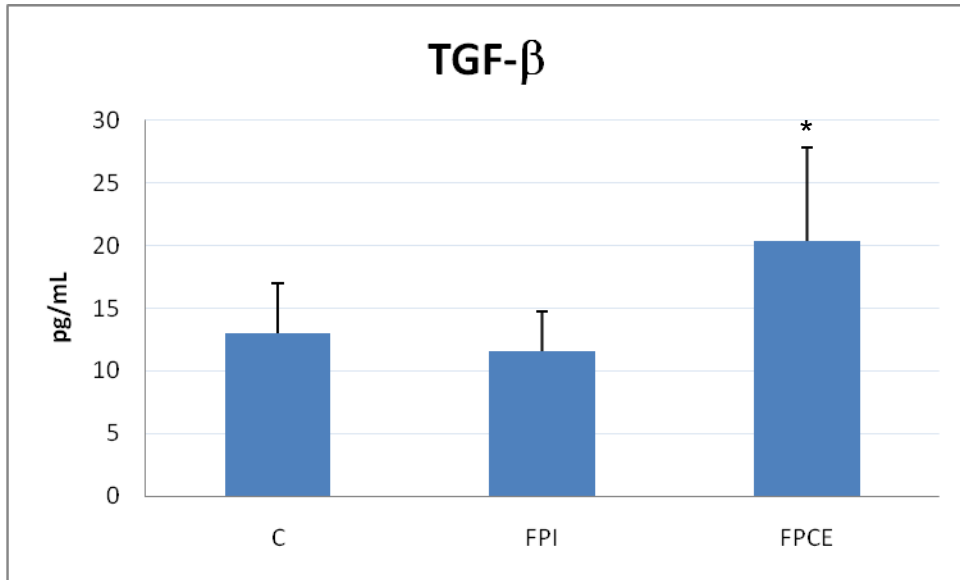


Figura 17. Concentración de TGF-β en LBA * p<0.05

Para determinar la concentración de TGF-α en LBA se realizó otro ensayo inmunoenzimático y como se puede observar en la fig. 18 las concentraciones de esta molécula en promedio resultaron sin diferencias significativas con promedios de 0.049 ± 0.12 vs. 0.039 ± 0.066 pg/mL para FPI y FPCE respectivamente.

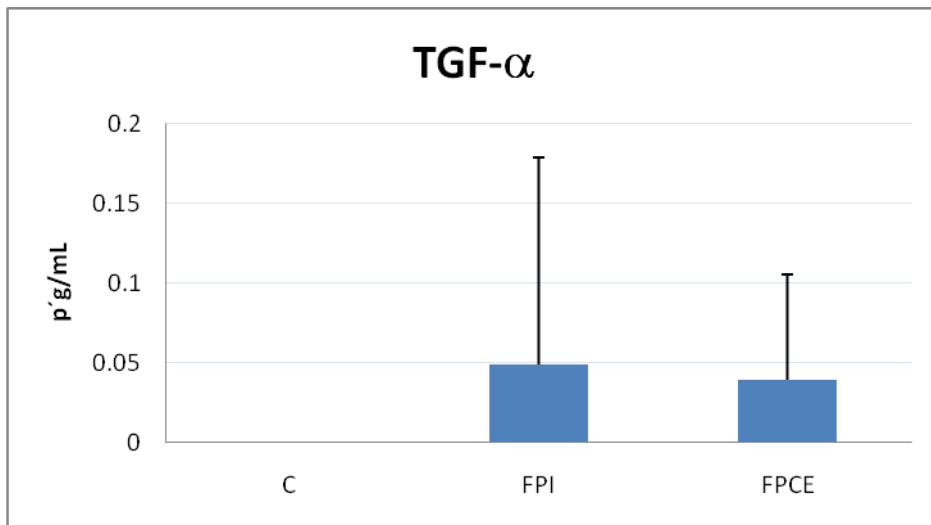


Figura 18. Concentración de TGF-α en LBA

DISCUSIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad crónica y degenerativa del parénquima pulmonar que se caracteriza por la proliferación y activación de células mesenquimatosas, formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos, y la acumulación exagerada de matriz extracelular, principalmente colágenas fibrilares. Aunque sus mecanismos patogénicos no se conocen con precisión, se ha sugerido que la FPI ocurre por la activación aberrante de las células epiteliales alveolares las cuales producen los mediadores responsables de provocar la migración, proliferación y activación de células mesenquimatosas, y su diferenciación a miofibroblastos. Entre los factores quimiotácticos y de crecimiento para fibroblastos destacan el TGF- β , PDGF y ET-1 (25). Esta enfermedad afecta principalmente a individuos mayores de 50 años y es la más agresiva de las neumopatías intersticiales siendo habitualmente letal en un plazo corto de tiempo (18-21).

Existen diferentes fenotipos clínicos de la FPI, uno de ellos es la fibrosis pulmonar combinada con enfisema, la cual se presenta principalmente en pacientes de sexo masculino y fumadores. El diagnóstico de este fenotipo se realiza mediante la tomografía axial computada de alta resolución donde se observan lesiones enfisematosas en los lóbulos superiores y fibróticas en los lóbulos inferiores. Los mecanismos por los cuales algunos pacientes desarrollan esta combinación de FPI más enfisema, la cual no ocurre en todos los pacientes fibróticos fumadores se desconoce. Adicionalmente, un gran número de los

pacientes que padecen este fenotipo combinado desarrollan hipertensión arterial pulmonar severa la cual afecta el pronóstico empeorando la sobrevida (26, 36).

En este sentido se conoce que la ET-1 es uno de los más potentes vasoconstrictores de los vasos que constituyen la circulación pulmonar y participa en la patogénesis de la hipertensión arterial pulmonar de varias etiologías. Este vasoconstrictor se produce en el pulmón por una gran variedad de células, incluyendo endoteliales, macrófagos, mastocitos y células del epitelio alveolar. Los niveles plasmáticos de ET-1 se encuentran elevados en pacientes con EPOC que presentan hipertensión pulmonar, en comparación con pacientes con este mismo padecimiento que no presentan hipertensión pulmonar. Así mismo, se ha reportado en FPI que el RNA mensajero de ésta molécula se encuentra sobreexpresado en células endoteliales, en neumocitos tipo II, y en células inflamatorias. Además de su función como vasoconstrictor, la ET-1 induce la expresión de factores proinflamatorios y profibroticos, como el TNF- α y puede actuar sinérgicamente con otras moléculas fibrogénicas como el TGF- β y PDGF (42-44).

Con base en estos antecedentes, en este estudio se midió la concentración de ET-1 en el LBA de pacientes con FPI, FPCE y un grupo control; sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles detectados de ET-1 entre los grupos de pacientes, y los niveles encontrados resultaron inferiores a los controles. En 2003 Bacakoğlu y cols. midieron la concentración de ET-1 en sangre periférica y LBA de pacientes con EPOC con y sin hipertensión pulmonar, y reportaron que el nivel de ET-1 no presentaba diferencias significativas entre

ambos grupos (45). Así, aunque la ET-1 puede ser un factor importante en el desarrollo de la hipertensión arterial pulmonar en diversas enfermedades respiratorias, existen otros factores que pueden estar implicados en la ocurrencia de este fenómeno, como la hipoxia.

Sin embargo, el objetivo principal de este proyecto fue el analizar una variedad de moléculas que podrían estar relacionadas con el desarrollo de la combinación de FPI y enfisema y que permitieran diferenciar a la FPCE de la FPI, ya que los pacientes con FPCE presentan un curso clínico de muy mal pronóstico, y una media de supervivencia menor que los pacientes con FPI. Las moléculas que se analizaron durante el desarrollo de este proyecto fueron diferentes metaloproteasas de matriz, las citocinas IL1- β , IL-5 e IL-8 y los factores de crecimiento PDGF-B, TNF- α , TGF- α y TGF- β , además de la mencionada ET-1.

Nuestros resultados mostraron que las moléculas que resultaron diferencialmente expresadas entre estos grupos de pacientes fueron MMP-9, IL-8 y TGF- β .

Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 se han estudiado de manera extensa tanto en modelos animales como en pacientes con enfermedades intersticiales, y una de las técnicas para evaluarlas es mediante su actividad degradativa en zimografías de gelatina, la cual es muy sensible a la actividad a estas enzimas. De manera importante, nuestros resultados mostraron una actividad substancialmente incrementada de MMP-9 en el grupo de FPCE en comparación con el grupo de FPI. En este sentido, ya se había reportado que la MMP-9, tanto a nivel de expresión génica como de proteína se encontraba elevada en los pulmones y LBA

de pacientes con FPI con la enzima localizada principalmente en células epiteliales, neutrófilos y macrófagos, con alguna tinción en fibroblastos subepiteliales (2). En un reporte previo se había sugerido que MMP-2, MMP-7, y MMP-9 se expresan en niveles similares en focos de fibroblastos de FPI y FPCE en áreas donde se observa la destrucción del tejido, y que en los tejidos pulmonares de los pacientes con FPCE, las moléculas mencionadas se expresaban en altos niveles en fibroblastos intersticiales (35). En nuestro estudio, la MMP-9 además de localizarse en los tipos celulares previamente mencionados se apreció en focos de fibroblastos en tejidos de pacientes con FPI y se observó una gran cantidad de neutrófilos asociados a vasos sanguíneos en los tejidos de FPCE; aunque es importante mencionar que no se presentaron diferencias significativas de estas células en el conteo diferencial. Adicional a nuestros resultados en actividad gelatinolítica y morfología, en el análisis mediante bio-plex el grupo de FPCE mostró una concentración significativamente mayor de MMP-9 en comparación con el grupo de FPI. Así, estos hallazgos sugieren que esta enzima está participando de manera importante en el desarrollo de FPCE. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales la MMP-9 participa en el desarrollo de esta enfermedad es aún desconocido y para conocer su papel será necesario realizar experimentos que exploren su papel in vivo y sus interacciones con otras moléculas a las que degrada o activa.

En este contexto, es importante señalar que uno de los sustratos principales de la MMP-9 son las membranas basales, y una excesiva actividad de esta enzima en el microambiente pulmonar se ha relacionado con la ruptura de estas

estructuras lo que favorece la apoptosis de las células del epitelio alveolar y deteriora la re-epitelización normal. Por otro lado, algunos estudios han demostrado que la MMP-9 puede activar a una variedad de mediadores biológicos, incluyendo al TGF- β latente, el cual es el más potente mediador profibrótico conocido (8, 46-47).

Dentro de este marco conceptual, es interesante destacar que otra molécula que resultó con diferencias significativas entre FPI y FPCE fue el TGF- β , la cual presentó una mayor concentración en el grupo de FPCE. Esta citocina es una molécula multifuncional y desempeña un papel clave en el desarrollo de la FPI, ya que induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, la transición epitelio mesénquima, la síntesis de moléculas de matriz, y promueve la apoptosis de células del epitelio alveolar. En pacientes con EPOC se ha reportado un incremento en la expresión de este factor de crecimiento en el epitelio bronquial y en los macrófagos de las vías aéreas pequeñas (26, 36, 48). Así, podemos sugerir que el TGF- β se incrementa en los pulmones con FPI y muestra un aumento adicional en aquellos pacientes que están desarrollando el fenotipo combinado de FPI y enfisema. La contribución que puede tener el tabaquismo en esta sobre-expresión adicional de MMP-9 y TGF- β se desconoce.

Finalmente, en este estudio encontramos que los pacientes con FPI sin enfisema mostraron un incremento importante en los niveles de IL-8 en el LBA. Esta interleucina-8 es una quimiocina perteneciente a la familia de las CXC, por lo que también es conocida como CXCL8, y su receptor se encuentra principalmente en neutrófilos, así como en linfocitos, células endoteliales y epiteliales (49). En

términos generales se considera un potente factor quimiotáctico para neutrófilos, y puede ser producido por una gran variedad de tipos celulares, incluyendo macrófagos, linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, hepatocitos, condrocitos y células tumorales, en respuesta a diferentes estímulos proinflamatorios. Esta quimiocina tiene un papel fundamental en la quimiotaxis de neutrófilos hacia los pulmones en la FPI, los cuales muestran un número incrementado de estas células inflamatorias en el LBA (50). Los macrófagos alveolares son la principal fuente de IL-8 en esta enfermedad.

Además de su papel como quimioatrayente de células inflamatorias, la IL-8 favorece la angiogénesis y su bloqueo selectivo inhibe de manera significativa la neovascularización en cortes de tejido pulmonar con FPI (51). En nuestro estudio la concentración de IL-8 resultó incrementada en muestras de LBA de pacientes con FPI en comparación con FPCE, aunque los neutrófilos en el conteo celular no presentaron diferencias entre ambos grupos. Así, es posible que los niveles más incrementados de IL-8 en FPI en comparación con FPCE no tengan relación con su función quimiotáctica sino con otras, como por ejemplo la angiogénesis. En este contexto, una remodelación vascular aberrante ha sido descrita en los pulmones con FPI.

CONCLUSIONES

El objetivo principal de este proyecto fue el identificar la existencia de moléculas que podrían estar relacionadas con el desarrollo de la combinación de FPI y enfisema y que permitan diferenciar a la FPCE de la FPI. En base a los resultados obtenidos se puede concluir que la MMP-9 es una enzima que está

actuando activamente en el desarrollo del fenotipo de FPCE, además de TGF- β y que IL-8 resultó con una menor concentración en este grupo. Este es uno de los primeros estudios en FPCE que permiten demostrar que de varias moléculas observadas, importantes en otras patologías, solo algunas se expresan diferencialmente y posiblemente nos permitan distinguir a la FPCE con fines diagnósticos, lo cual implica un nuevo conocimiento en los mecanismos de esta enfermedad. Será necesario diseñar nuevos experimentos que nos ayuden a conocer las interacciones funcionales que estas moléculas tienen en el ambiente de FPCE.

BIBLIOGRAFÍA

1. - Petechuk D. The respiratory system. **Greenwood Press** 2004.
2. - Pardo A, Selman M. Matrix Metalloproteases in aberrant Fibrotic Tissue Remodeling. **Proc Am Thorac Soc** 2006; 3: 383-388.
3. - Functional ultrastructure atlas of tissue biology and pathology. **SpringerWien New York** 2005.
4. - Alberts B, Johnson A, Lewis J. Molecular Biology of the Cell. 4th edition New York:**Garland Science** 2002.
5. - Divoux A, Clément K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. **Obes Rev** 2011; 12: 494-503.
6. - Pardo A, Selman M. Matriz extracelular en : biología celular y molecular, Jimenez LF y Merchant. **Prentice Hall** 2003; 515-540.
7. - Pardo A, Selman M, Kaminski N. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. **Int. J. Biochem. & Cell Bio** 2008; 40: 1141–1155.
8. - Parks W, Wilson C, Lopez-Boado Y. Matrix Metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat Rev Immun** 2004; 4: 617-629.
- 9.- Pardo A. Metaloproteasas de Matriz en la Remodelación aberrante de la Fibrosis Pulmonar **Mensaje Bioquímico** 2008; 32: 39-48.
10. - Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. **Biochem J** 1995; 309: 299–306.

11. - Uría JA, López-Otín C. Matrilysin-2, a New Matrix Metalloproteinase Expressed in Human Tumors and Showing the Minimal Domain Organization Required for Secretion, Latency, and Activity. **Cancer Res** 2000; 60: 4745-4751.
12. - McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-Cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. **Am J Pathol** 2003; 162: 1831-1843.
13. - Luo D, Mari B, Stoll I, Anglrd P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. **J Biol chem** 2002; 277: 25527-25536.
14. - Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digest interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. **J Biol chem** 1997; 272: 2446-2451.
15. - Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. **Int J Biochem Cell Biol** 2005; 37: 283-288.
16. - Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R. Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. **Mol Biol Cell** 2003; 14: 4569-4580.
17. - Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jahkola T, Suomela S, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. **J Invest Dermatol** 2002; 119: 14-21.

18. - Schwarz M I. Approach to the understanding, diagnosis, and management of interstitial lung disease. **Interst Lung Dis** :Schwarz M.I., King T.E., B.C. **Decker Inc** 1998; 3-30.
19. - Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: progress in understanding its pathogenesis and implications for therapy. **Ann Intern Med** 2001; 134: 136-151.
20. - Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. **Front in Bioscience** 2002; 7: D1743-1761.
21. - Pandit K, Milosevic J, Kaminski N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis **Translational Research** 2011; 157 :191-199.
22. - King TE Jr, Tooze JA, Schwartz MI, Brown KR, Cherniack RM. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. **Am J Respir Crit Care Med** 2001; 164: 1171-1181.
23. - American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). **Am J Respir Crit Care Med** 2000; 161: 646–664.
24. - Nadrous HF, Pellikka PA, Krowka MJ, Swanson KL, Chaowalit N, Decker PA. Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **Chest** 2005; 128: 2393-2399.
25. - Harari S, Caminati A. IPF: new insight on pathogenesis and treatment. **Allergy** 2010; 65: 537–553.
26. -Selman M, Navarro C, Gaxiola M. Fibrosis pulmonar idiopática: en busca de un tratamiento eficaz. **Arch Bronconeumol** 2005; 41 :15-20.

27. -Selman M, Mejía M, Pardo A. Fibrosis pulmonar idiopática. **Rev Invest Clín** 2009; 3: 233-242.
28. - Sharafkhaneh A, Hanania N, Kim V. Pathogenesis of Emphysema From the Bench to the Bedside. **Proc Am Thorac Soc** 2008; 5: 475–477.
29. - Evans MD, Pryor WA. Cigarette smoking, emphysema, and damage to alpha 1-proteinase inhibitor. **Am J Physiol** 1994; 266: L593–L611.
30. -Cosio MG, Majo J. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. **Chest** 2002; 121: 160S-165S.
31. - Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. **Chest** 2000; 117: 684–694.
32. - Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med** 2001; 163: 1304–1309.
33. - Auerbach O, Garfinkel L, Hammond E. Relation of smoking and age to findings in lung parenchyma: a microscopic study. **Chest**. 1974; 65: 29-35.
- 34.- Cottin V, Nunes H, Brillet PY, Delaval P, Devouassoux G, Tillie-Leblond I, Israel-Biet D, Court-Fortune I, Valeyre D, Cordier JF. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. **Eur Respir J** 2005; 26: 586–593.
35. - Rogliani P, Mura M, Mattia P, Ferlosio A, Farinelli G, Mariotta S, Graziano P, Pezzuto G, Ricci A, Saltini C, Orlandi A. HRCT and histopathological evaluation of fibrosis and

tissue destruction in IPF associated with pulmonary emphysema. **Respir Med** 2008; 102:1753-1761.

36. - Portillo K, Roldán J, Morera J. Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema. **Arch Bronconeumol** 2010; 46: 646-651.

37. - Munson J.C. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a high-pressure situation. **Eur Respir J** 2010; 35: 9–11.

38. - Hardie WD, Piljan-Gentle A, Dunlavy MR, Ikegami M, Korfhagen TR. Dose-dependent lung remodeling in transgenic mice expressing transforming growth factor-alpha. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2001; 281: L1088-1094.

39.- Hoyle GW, Li J, Finkelstein JB, Eisenberg T, Liu JY, Lasky JA, Athas G, Morris GF, Brody AR. Emphysematous lesions, inflammation, and fibrosis in the lungs of transgenic mice overexpressing platelet-derived growth factor. **Am J Pathol** 1999; 154: 1763-1775.

40. - Miyazaki Y, Araki K, Vesin C, Garcia I, Kapanci Y, Whitsett JA, Piguet PF, Vassalli P. Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. **J Clin Invest** 1995; 96: 250-259.

41. - Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramos C, Selman M, Pardo A. Cigarette smoke exposure potentiates bleomycin-induced lung fibrosis in guinea pigs. **Am J Physiol** 2003; 285: L949–956.

42. -Trakada G, Tsourapis S, Marangos M, Spiropoulos K. Arterial and bronchoalveolar lavage fluid endothelin-1 concentration in asthma. **Resp Med** 2000; 94: 992–996.

43. -Kwon Y.S. Plasma C-Reactive Protein and Endothelin-1 Level in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Pulmonary Hypertension. **J Korean Med Sci** 2010; 25: 1487-149.
44. - Brown K, Swigris J. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. **BioDrugs** 2010; 24: 49–54.
45. - Bacakoğlu F, Atasever A, Ozhan MH, Gurgun C, Ozkilic H, Guzelant A. Plasma and bronchoalveolar lavage fluid levels of endothelin-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension. **Respiration** 2003; 70: 594-599.
46. - Yu Q, Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes Dev** 2000; 14: 163–176.
47. - Ji Young Kim,¹ Hyun Cheol Choeng,^{2,3} Cheolmin Ahn,² and Sang-Ho Cho Early and Late Changes of MMP-2 and MMP-9 in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. **Yonsei Med J** , 2009; 50 : 68-77.
48. - Khalil N, Parekh T V, O'Connor R, Antman N, Kepron W, Yehaulaeshet T, Xu Y D, Gold L I. Regulation of the effects of TGF- β 1 by activation of latent TGF- β 1 and differential expression of TGF- β receptors (T β R-I and T β R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. **Thorax** 2001; 56: 907–915.
49. - Huang F, Geng XP. Chemokines and hepatocellular carcinoma. **World J Gastroent** 2010; 16: 1832-1836.

50. - Xaubet A, Agustí C, Luburich P, Barbera J A, Carrion M, Ayuso M C, Roca J, Rodriguez-Roisin R. Interleukin-8 expression in bronchoalveolar lavage cells in the evaluation of alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis **Resp Med** 1998; 92: 338-344.

51. - Agostini C, Gurrieri C. Chemokine/Cytokine Cocktail in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Proc Am Thorac Soc** 2006; 3: 357–363.