



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EXPRESIÓN DE LA METALOPROTEINASA DE  
MATRIZ 28 EN FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MARIEL SOFÍA MALDONADO BONILLA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JORGE ANTONIO GARCÍA ALVAREZ  
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.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos de la alumna

Maldonado  
Bonilla  
Mariel Sofía  
56168334  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
407012206

### 2. Datos del tutor

Dr.  
García  
Alvarez  
Jorge Antonio

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Cano  
Colín  
Saúl

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Ruiz  
López  
Víctor Manuel

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C  
Ramírez  
Rangel  
María de los Remedios

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
De la Cruz  
Laina  
María Isabel

### 7. Datos del trabajo escrito

Expresión de la metaloproteinasa de matriz 28 en fibrosis pulmonar idiopática  
48 p  
2011

## **AGRADECIMIENTOS**

A Daniela Esther, Luis David, M. Esther Bonilla y Daniel Héctor Maldonado.

A mi tutor el Dr. Jorge Antonio García Álvarez, por cada recomendación, cada consejo, cada palabra de aliento, cada recordatorio, cada regaño, cada broma, muchas gracias.

A mis jurados: Dr. Saúl Cano, Dr. Víctor Ruiz, M. en C. Remedios Ramírez y M. en C. Isabel De la Cruz, por sus correcciones, observaciones y comentarios tan valiosos.

A la Dra. Annie Pardo Cemo por sus enseñanzas, apoyo, encomiendas y sobretodo por creer en este proyecto.

A mis amigos y compañeros del taller, del laboratorio y del grupo de trabajo: Semiramis y Ricardo, David, Jazmín, Luis, Adrián, Sandra, Angélica, Paul, Miguel N., Miguel C., Iliana, Alfredo, Gustavo, etc.. Por permitirme aprender de ellos, indicarme cómo hacer eficazmente el trabajo, recordarme que soy pequeña, ayudarme y brindarme su confianza. En especial gracias al Dr. Moisés Selman. Y nuevamente, gracias a mi madrina Reme, porque la palabra es compartir.

Al viento y a hugo, por dejarnos caminar juntos en este camino. A mis otros hermanitos Pamelita, Magui y Javier. A Vaquita QEPD. A la Profesora Laura Granados. A mis amigos de la UNAM por enseñarme que no todo en la vida son proteínas: Daniel D., Mar, Aldo, Adri U., Cris, Marina, Iván R., Adri S., Alan, Rodrigo J., Dafne, Viri, Tole, Cane, Fernando, Irwing, Dan, Armando, Paulina V., Vane, Champi, Sebastián, y por supuesto también gracias a Noe.

A la Facultad de Ciencias, sus profesores e investigadores, a la Q.F.B. Brenda Gasca y a la Dirección General de Cooperación e Internacionalización (DGECI), a toda la UNAM, al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas" y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Finally I thank Leland Stanford Junior University and the Stanford Summer International Honors Program 2011 Staff.

“El talento es algo bastante corriente. No escasea la inteligencia, sino la constancia.”

*Doris Lessing*

“Lo bueno, si breve, dos veces bueno; y aún lo malo, si poco, no tan malo”.

*Baltasar Gracián*

## Resumen

La matriz extracelular (MEC) es una red compleja de polisacáridos, proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos secretados por las células, entre los límites epitelial y endotelial de los animales multicelulares<sup>1</sup>. La degradación específica de MEC se lleva a cabo en gran medida por metaloproteinasas de matriz (MMP)<sup>2</sup>, cuyo miembro más recientemente encontrado es la MMP-28, también llamada epilisina. Su gen cuenta con un marco abierto de lectura de 1560 nucleótidos y codifica para una proteína de 520 residuos de aminoácidos (aa). Además de degradar caseína, no se conoce ninguna otra actividad específica que realice esta enzima<sup>3,4</sup>.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva y letal, de etiología desconocida, en la que existe una remodelación alterada de la MEC<sup>5</sup>. En un análisis de microarreglos realizado en 2008 por Pardo y cols.<sup>6</sup> se encontró, a partir de biopsias de tejido, que el mRNA de la MMP-28 está sobreexpresado en FPI con respecto a pulmones controles; sin embargo, este resultado no ha sido corroborado por análisis de RT-PCR cuantitativo, ni se conoce la localización de la proteína en tejido pulmonar *in vivo*. Por lo que los objetivos de esta tesis fueron analizar la expresión génica de la MMP-28 en FPI, cuantificándola con un ensayo de PCR en tiempo real (qPCR); así como determinar la localización de la proteína en tejido pulmonar con y sin FPI, mediante la técnica de inmunohistoquímica.

La expresión de la epilisina no fue mayor en las muestras estudiadas de pulmón con FPI comparándolos con muestras de pulmones *normales*. Mediante el estudio inmunohistoquímico se identificó la presencia de la MMP-28 principalmente en los núcleos de las células epiteliales alveolares en pacientes con FPI; así como en el citoplasma de células epiteliales bronquiales y en leucocitos. En las muestras de tejido pulmonar consideradas normales, no se observó tinción positiva en ningún tipo celular analizado. Utilizando a las células A549 como modelo de células epiteliales de pulmón, se realizó inmunofluorescencia, donde también se observó marca positiva en núcleos. Finalmente, se llevó a cabo una búsqueda de secuencias de localización nuclear (SLN) con dos programas de software libre que arrojaron una secuencia de aa como probable SLN. Los resultados invitan a estudiar la relación de la MMP-28 con el núcleo celular y si existe una regulación diferencial para la misma en condiciones fisiológicas y patológicas (FPI) en pulmón humano.

## Abreviaturas

aa	residuo de aminoácido
$\alpha$ -SMA	alfa actina de músculo liso
AEC	3-amino-9-etil-carbazol
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
$\sigma$	desviación estándar
DAPI	4', 6-diamino 2-fenil-indol
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPI	enfermedad pulmonar intersticial
FPI	fibrosis pulmonar idiopática
IGF	factor de crecimiento tipo insulina
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinasa(s) de matriz
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MT-MMP	metaloproteinasa de matriz tipo membrana
pb	pares de bases
PBS	solución amortiguadora salina de fosfatos
PBS + t	PBS con tween-20 al 1%
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR cuantitativa)
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
RT-PCR	transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
SLN	secuencia(s) de localización nuclear
TBS	solución amortiguadora salina de Tris-HCl
TEM	transición de epitelio a mesénquima
TIMP	inhibidor(es) tisular(es) de metaloproteinasas
TGF- $\beta$ 1	factor de crecimiento transformante beta-1
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa

## ÍNDICE

	<b>PÁGINA</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
a. La matriz extracelular	7
b. Las metaloproteinasas de matriz	8
c. Epilisina, la metaloproteinasa de matriz 28	10
d. Fibrosis pulmonar idiopática	13
<b>II. OBJETIVOS</b>	18
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	19
<b>IV. RESULTADOS</b>	
Extracción y cuantificación de RNA total para RT-PCR	26
Curva patrón y PCR en tiempo real	27
Inmunohistoquímica	29
Inmunofluorescencia	29
Búsqueda de secuencias de localización nuclear	33
<b>V. DISCUSIÓN</b>	34
MMP en núcleo	37
Secuencias de localización nuclear	40
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	41
<b>VII. REFERENCIAS</b>	42

## I. INTRODUCCIÓN

### A. La matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es una red compleja de polisacáridos, proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos secretados por las células, entre los límites epitelial y endotelial de los animales multicelulares<sup>1</sup>. No sólo une a las células entre sí y ayuda a organizar los tejidos, sino que también activa vías de señalización influenciando su sobrevivencia, migración, desarrollo, polaridad y proliferación. Muchas de las funciones de la MEC están mediadas por moléculas de adhesión celular transmembranales que pueden actuar como receptores para algunos componentes de la MEC, como las integrinas, que se unen directamente y con distintos grados de especificidad a ciertos componentes de la matriz e interactúan con el citoesqueleto a través de proteínas adaptadoras generando diversas señales intracelulares<sup>2, 7</sup>.

Los tipos de moléculas más abundantes en la MEC son: 1) Glicosaminoglicanos, polímeros lineales de disacáridos que se repiten; habitualmente, uno de los componentes del disacárido es ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico, o bien, D-galactosa, mientras que el otro componente es N-acetilglucosaminoglicano o N-acetilgalactosamina; con frecuencia, uno o ambos tienen al menos un grupo aniónico (carboxilato o sulfato) que tiene un efecto osmótico atrayendo agua. 2) Proteoglicanos, proteínas unidas covalentemente a, por lo menos, una cadena de glicosaminoglicano. 3) Colágenas, tanto fibrilares (tipos I, II, III, V, XI, XXIV y XXVII), como laminares (IV, VIII y X) y asociadas a fibras (IX, XII, XIV, etc.). Y 4) glicoproteínas adhesivas, como la entactina, fibronectina y laminina, proteínas con múltiples dominios responsables de unir varios componentes de la MEC entre sí y con proteínas de adhesión celular, así como a moléculas de señalización solubles; por ejemplo, factores de crecimiento<sup>2, 7</sup>.

La membrana basal es un tipo de MEC especializada que determina la arquitectura de un tejido epitelial, bajo el cual casi siempre se encuentra algún tipo de tejido conjuntivo. La membrana basal desempeña funciones importantes durante la regeneración de heridas y en el desarrollo embrionario. La mayoría de sus elementos son sintetizados por las células que se encuentran sobre ella. Sus componentes principales son: colágena tipo IV, laminina, entactina y perlecano<sup>7</sup>.

La habilidad de las células para degradar la MEC, es tan importante como su habilidad de sintetizarla e interactuar con ella. La degradación de la MEC se necesita en procesos como la reparación tisular, y en animales adultos, existe cierto recambio lento y continuo, fundamental para mantener la homeostasis tisular. Desde el punto de vista de una célula individual, degradar la MEC le permite dividirse, así como migrar a través de ella. Por ejemplo, los leucocitos requieren una degradación localizada para lograr la transvasación hacia un tejido infectado o lesionado. En general, los componentes de la MEC son degradados por enzimas proteolíticas que pertenecen a una de dos familias: metaloproteinasas de matriz y serín proteasas<sup>2</sup>.

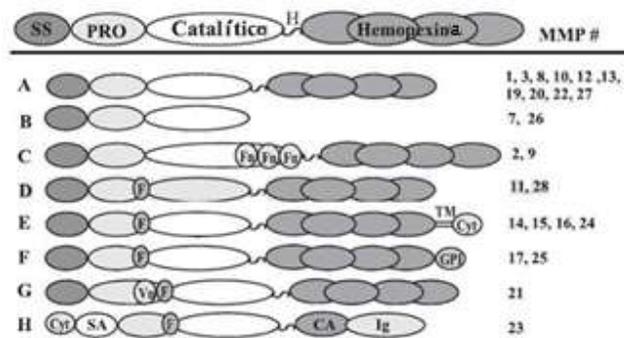
## **B. Las metaloproteinasas de matriz**

Las metaloproteinasas son una subfamilia de proteasas que emplean un catión divalente en su sitio activo, principalmente zinc, para activar una molécula de agua que actúa como nucleófilo e hidroliza un enlace peptídico del sustrato. La mayoría de las metaloproteinasas de matriz (MMP), también llamadas matrixinas, se secretan, otras se expresan como enzimas de superficie (MT-MMP) ancladas directamente a la membrana plasmática o vía glucosilfosfoinositol, y además algunas pueden actuar intracelularmente<sup>3</sup>.

<sup>8</sup>.

La estructura general de las MMP está compuesta por los siguientes dominios (fig. 1): un péptido señal, un prodominio con la secuencia conservada PRCGXPD en la que un

residuo de cisteína interactúa con el ion de  $Zn^{2+}$  para mantener a la proteína como zimógeno, el dominio catalítico caracterizado por la secuencia HEXGHXXGXXHS, en donde los tres residuos de histidina unen el  $Zn^{2+}$ , una región tipo bisagra rica en prolinas, y finalmente, un dominio tipo hemopexina que consiste de cuatro fragmentos organizados como pétalos, que determina la afinidad por el sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos<sup>3, 8, 9</sup>.



**Figura 1.** Dominios estructurales de las MMP humanas. SS, secuencia señal; PRO, prodominio; H, región tipo bisagra; hemopexina, dominio tipo hemopexina; Fn, insertos tipo II de fibronectina; F, sitio de unión a propeptid convertasas tipo furina; TM, dominio transmembranal; Cyt, dominio citoplasmático; GPI dominio de anclaje mediante glucosilfosfatidilinositol; Vn secuencia tipo vitronectina; CA arreglo de cisteínas; Ig, dominio tipo inmunoglobulina; SA, señal de anclaje [modificado de 10 (Illman *et al.* 2008)].

En humanos existen 23 MMP, las cuales en conjunto, pueden degradar todos los componentes de la MEC; asimismo, pueden actuar sobre sustratos que no son de la matriz, tales como: quimiocinas, receptores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, ligandos apoptóticos y factores angiogénicos<sup>9, 7</sup>.

La actividad de las MMP está regulada de manera precisa tanto a nivel transcripcional, como postraducciona controlando la activación de zimógenos y por acción de inhibidores endógenos. La activación de los zimógenos se lleva a cabo por dos mecanismos principales, uno involucra el corte proteolítico del prodominio y el otro consiste en desplazarlo del sitio catalítico sin eliminarlo, es decir, mediante activación

alostérica; además, algunas se activan intracelularmente por una proproteín convertasa como la furina<sup>8,9</sup>.

Los principales inhibidores endógenos de las MMP son los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP). Éstos modulan la proliferación y migración celular, promueven la plasticidad sináptica y cuentan con funciones antiangiogénicas, pro y antiapoptóticas, que pueden derivar de la inhibición de algunas MMP porque la regulación del catabolismo de la MEC influye en estos fenómenos, pero también muchas veces son independientes de dicha inhibición. En el genoma humano hay cuatro genes parálogos (TIMP-1 a -4), de los cuales TIMP-3 tiene el espectro más amplio. La interacción con los dominios tipo hemopexina de la proMMP se da con el dominio carboxilo terminal del TIMP correspondiente<sup>11</sup>.

### **C. Epilisina, la metaloproteínasa de matriz 28**

El miembro más recientemente encontrado de las MMP es la MMP-28. Fue clonada de bibliotecas de cDNA de testículo y queratinocitos humanos, pero también se obtuvo de cDNA de pulmón (en etapa fetal y en adulto normal). Además, se expresa en diversos órganos como riñón, intestino, colon y páncreas en adulto; cerebro y músculo esquelético en etapas fetales, y en algunos tipos de cáncer como el ovárico, pancreático, el oral de células escamosas (OSCC) y en la línea celular A549 que corresponde a adenocarcinoma pulmonar<sup>3, 12, 13</sup>.

Dada su expresión prominente en epidermis y su actividad catalítica de proteólisis, se le llamó epilisina<sup>11</sup>. Está presente en la MEC y en el citoplasma de las células de discos intervertebrales degenerados<sup>14</sup>, se sobreexpresa en queratinocitos cercanos a heridas<sup>15</sup> y en el cartílago de pacientes con osteoartritis y artritis reumatoide<sup>16, 17</sup>; así como en pacientes de cáncer gástrico y en varias líneas de la misma patología (BGC823, SNU16, SNU5, MGC803, SGC901, AGS, PAMC82 y MKN45), correlacionando con la menor

sobrevivencia de los pacientes y mayor habilidad invasora de las células<sup>18</sup>. En el ratón se expresa durante el desarrollo y regeneración del sistema nervioso, antes de la mielinización<sup>19</sup>.

A diferencia de los demás genes humanos para MMP, de los cuales ocho se localizan en el cromosoma 11, el gen de la MMP-28 se ubica en el cromosoma 17, específicamente en el locus 17q11.2<sup>12</sup>. Tiene ocho exones –la mayoría de las otras MMP tiene diez— y destaca la longitud de su primer intrón (25, 000 pb); al mismo tiempo, posee un marco abierto de lectura de 1560 nucleótidos que codifica para una proteína de 520 aa<sup>3</sup>. En cuanto a homología dentro de la familia de las MMP, la MMP-28 se ubica más cercana a la MMP-19 con un porcentaje de identidad a nivel de aa del 40%<sup>12</sup>.

La MMP-28 tiene un péptido señal de 22 aa que la caracterizan como enzima de secreción, seguido de un prodominio de 106 aa y de un sitio de unión a furina sugiriendo que ésta o proteínas convertasas relacionadas, están involucradas en su procesamiento y secreción<sup>12</sup>; al menos se ha comprobado que en células HeLa (carcinoma cervical), la furina es necesaria para la activación del zimógeno<sup>20</sup>. Y aunque se observó que en ratón parece que la furina interactúa con la MMP-28 como chaperona proteolítica favoreciendo la secreción de la forma activa<sup>21</sup>, también se vio en células COS1 (fibroblastos renales de simio, immortalizados y comúnmente empleados en ensayos de transfección) que la furina ayuda a la secreción de la MMP-28 uniéndose a un sitio distinto al que clásicamente reconoce la convertasa (la secuencia RxK/RR, común para varias MMP), sino que específicamente se une al motivo Tyr45-Leu46 localizado en la secuencia YGYL, conservada para todas las MT-MMP, MMP-19 y MMP-28. Y más interesante aún, se vio que cuando la furina participa en la secreción de la epilisina, lo hace como chaperona no proteolítica, esto es, sin cortar el prodominio<sup>22</sup>.

La estructura de la MMP-28 continúa con el dominio catalítico de 156 aa, y con una región tipo bisagra de 36aa. Finalmente, posee un dominio tipo hemopexina de 200aa<sup>3, 12</sup>.

Éste último es suficiente para que la enzima pueda adherirse a la membrana plasmática de células epiteliales (A549, adenocarcinoma pulmonar; MDCK, epitelio renal canino, y A431, carcinoma epidermoide), no así a células de fibrosarcoma (HT-1080)<sup>4</sup>.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) estimula la expresión de la MMP-28 en cultivos primarios de queratinocitos humanos, pero no otros factores de crecimiento como son: factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 1beta (IL-1b), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) ni factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1)<sup>15</sup>.

La epilisina con el prodominio pesa 58kDa y en su forma activa, 48kDa<sup>4</sup>. Esta enzima degrada caseína<sup>3</sup>, un sustrato común para otras MMP: MMP-1, -3, -7 -9, -10, -13, -19 y -27<sup>10</sup>. Se considera que ayuda a la reparación de heridas en piel, donde se expresa en queratinocitos basales unidos a membrana basal intacta<sup>15</sup>. Se ha sugerido que inicia una cascada de proteasas asociada con algún activador presente en el suero fetal bovino, que lleva a la degradación tanto de colágena tipo IV como de laminina tipo I e incluso de fibronectina<sup>23</sup>.

La sobreexpresión de la epilisina en células A549 induce la transición de epitelio a mesénquima (TEM) irreversible, vía la activación de TGF- $\beta$  latente, asociada con pérdida de la expresión de cadherina-E, disminución de la MMP-2 (gelatinasa A) y aumento de las MMP-9 (gelatinasa B) y MMP-14 (MT1-MMP)<sup>4, 10</sup>.

Se ha caracterizado que se deposita específicamente, en la MEC que subyace al dominio basolateral en epitelios de A549, MDCK y células HeLa<sup>23</sup>. Como ya se dijo, en células de discos intervertebrales degenerados se localizó en citoplasma<sup>14</sup>. En otros ensayos de inmunocitoquímica con la línea celular SW1353 de condrosarcoma,

transfectadas con la MMP-28 activa, se mostró una tinción perinuclear y en superficie celular<sup>20</sup>.

#### **D. Fibrosis pulmonar idiopática**

El pulmón es el órgano en el que se lleva a cabo el intercambio gaseoso entre el aire atmosférico y la sangre, específicamente en los alveolos. Las paredes de los alveolos están formadas por células epiteliales, y están cubiertas por una extensa red de capilares sanguíneos. El epitelio alveolar está constituido 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 que son células con bordes redondeados y superficie con microvellosidades; este tipo celular produce el líquido surfactante, una mezcla de fosfolípidos y proteínas cuya función principal es reducir la tensión superficial, permitiendo la dilatación y distensión de los alveolos sin peligro de colapsar durante el proceso de ventilación, al mismo tiempo que provee humedad a la superficie para llevar a cabo un intercambio gaseoso eficiente<sup>24, 25</sup>.

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un diverso grupo de desórdenes pulmonares conocidos como enfermedades pulmonares intersticiales (EPI). En ellos, la fibrosis resulta del daño crónico al parénquima pulmonar y se caracteriza por la acumulación excesiva de proteínas de MEC, principalmente colágena fibrilar tipo I. El proceso fibrosante en las EPI no está restringido al intersticio –espacio entre el epitelio alveolar y la membrana basal del endotelio— sino que también se observa en los espacios alveolares<sup>5</sup>.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es un tipo específico de este grupo de desórdenes, siendo una enfermedad crónica, progresiva y frecuentemente letal de etiología desconocida<sup>26</sup>, que parece surgir de la interacción entre factores genéticos y ambientales<sup>27</sup> y que afecta a cinco millones de personas en el mundo. La prevalencia

anual estimada de FPI es ligeramente mayor en hombres (20.2 por cada 100,000), que en mujeres (13.2 por cada 100,000), y la edad media en que se presenta es a los 66 años<sup>28</sup>.

La FPI es el desorden pulmonar fibrótico más agresivo, incluso cuando no hay complicaciones adicionales, la mayoría sobrevive entre dos y cinco años después de que se confirmó la enfermedad (los síntomas preceden al diagnóstico en un rango de seis meses a dos años). A diferencia de cualquier fibrosis que aparece después de un proceso inflamatorio, la hipótesis vigente señala que en la FPI un daño al epitelio alveolar, seguido de la producción de mediadores profibrosantes, hacen un llamado a la reparación que, por razones aún no esclarecidas completamente, nunca se resuelve y sobreviene la fibrosis<sup>26, 28, 29</sup>. La causa del daño epitelial es desconocida; es probable que no se trate de un mecanismo único, sino de una combinación de daños que potencialmente contribuyan al desarrollo de la enfermedad<sup>5</sup>.

La sensación de falta de aire –disnea– es uno de los primeros y principales síntomas, otros son tos seca y pérdida de las funciones pulmonares. Los depósitos exacerbados de MEC se localizan típicamente en la zona baja de los pulmones, predominantemente hacia la periferia. No se presenta la neovascularización observada en otros procesos fibrogénicos y la inflamación es mínima. El diagnóstico requiere que se correlacionen los datos clínicos de imágenes radiográficas con una biopsia<sup>26, 28, 29</sup>.

Normalmente, después del daño pulmonar, los neumocitos se regeneran y reemplazan las células necróticas o apoptóticas; sin embargo, si la magnitud del daño sobrepasa los mecanismos de respuesta tisular para contrarrestarlo y/o el daño persiste, o bien, si tienen lugar fenómenos no controlados, entonces la regeneración falla y el parénquima es sustituido por abundante MEC como un intento del tejido para reparar el daño, con la subsecuente destrucción de la arquitectura y funciones pulmonares<sup>5</sup>.

La reepitelización es el proceso por el cual el epitelio alveolar restaura su integridad en condiciones normales. Consta de la proliferación, migración y diferenciación de los

neumocitos tipo II a tipo I. En contraste, en la FPI, además de que los neumocitos tipo I mueren o sufren daño, se dice que hay hiperplasia de neumocitos tipo II o cuboidalización del epitelio alveolar, se altera la expresión de moléculas de adhesión y frecuentemente se modifica el surfactante llevando a un colapso alveolar. Las áreas de epitelio alveolar apoptótico coinciden con la presencia de focos de miofibroblastos<sup>29</sup>. Posiblemente no se lleva a cabo una apropiada reepitelización, por ausencia del receptor de los productos finales de glicosilación avanzada (RAGE), el cual ayuda a los neumocitos tipo I a unirse a la membrana basal<sup>27</sup>.

La FPI se caracteriza principalmente por: i) la activación de fibroblastos dependiente de epitelio, esto es, migración y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos que forman focos particulares, ii) un aumento en la síntesis y activación de citocinas fibrogénicas (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF e IGF, entre otros), y iii) la ausencia de reepitelización y metabolismo alterado de la MEC<sup>29</sup>. Asimismo, es característica la paradoja de la apoptosis en este proceso, la cual consiste en que los fibroblastos y miofibroblastos se vuelven resistentes a la apoptosis, mientras las células epiteliales mueren en el mismo microambiente, siendo que la respuesta normal a la regeneración tendría que proceder con la eliminación de los fibroblastos y miofibroblastos<sup>30</sup>. Una posible explicación a la paradoja está dada por la disminución en la actividad de PTEN y consecuente activación de la vía PI3K-Akt en fibroblastos de FPI<sup>31</sup>. O bien, por la deficiencia en prostaglandina E2 observada en FPI; puesto que, este eicosanoide protege a los neumocitos de la apoptosis, al tiempo que aumenta la muerte celular programada de fibroblastos y miofibroblastos<sup>32</sup>.

Como respuesta al daño pulmonar, se sabe que, además de que las células mesenquimatosas migran, proliferan, y sintetizan MEC, parte de los fibroblastos y miofibroblastos provienen de células epiteliales que experimentaron TEM, mientras que

otros tienen orígenes extrapulmonares proviniendo de células troncales derivadas de médula ósea y fibrocitos circulantes<sup>5</sup>.

La migración y el reclutamiento de los fibroblastos hacia el espacio alveolar ocurren a través de la ruptura parcial de las membranas basales como consecuencia de la actividad de MMP<sup>5</sup>, <sup>33</sup>. Una de las principales es la MMP-7, expresada por el epitelio alveolar junto con osteopontina, que estimula a los fibroblastos para sintetizar MEC. Además de que la MMP-7 y la osteopontina se activan mutuamente. Asimismo, los neumocitos producen MMP-1, -2, -3, -9, -14, -15, -16, -19 y -24. Mientras que los fibroblastos pulmonares se caracterizan por un incremento en la expresión de procolágena  $\alpha 1$ , MMP-2, -9 y los cuatro TIMP<sup>3, 27, 34</sup>.

En los lavados bronquioalveolares de pacientes con FPI se observan primordialmente macrófagos (80.6%), secundados por linfocitos (13.5%) y en menor proporción neutrófilos y eosinófilos (3.5 y 2.1% respectivamente). Además, a partir de biopsias se evaluó que los pacientes con FPI tienen sobreexpresadas proteínas de MEC, específicamente las colágenas tipo I, III, IV, VII, XIV, XV, XVII, XVIII, XXVII, fibronectina tipo III, el proteoglicano condroitín sulfato; así como cadherina-N, cadherina-P, osteopontina, tenascina, receptor de TGF- $\beta$ , receptor de interleucina 13 y del TNF- $\alpha$ <sup>35</sup>.

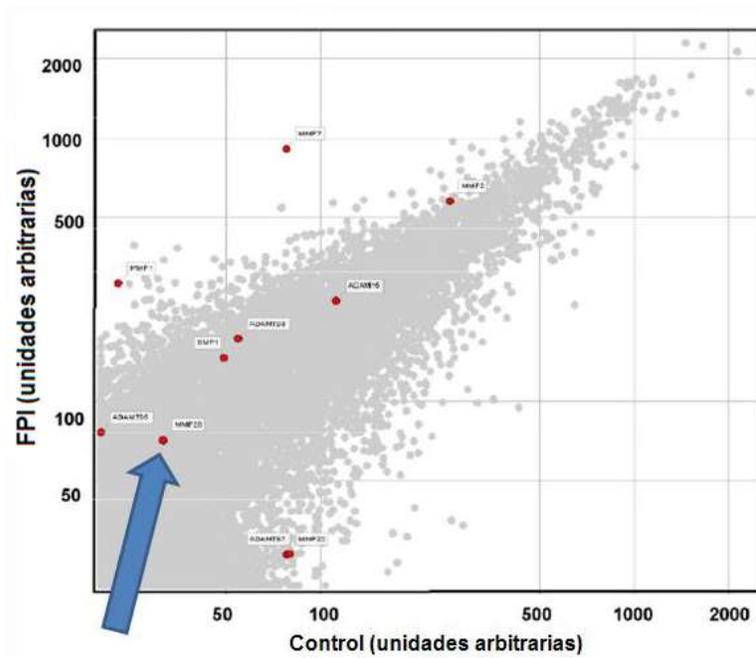
Una citocina clave en la fibrosis pulmonar es el TGF- $\beta 1$ , el cual provoca una disminución en la producción de surfactante, un aumento en la síntesis de MEC en células epiteliales alveolares e induce la TEM, puesto que transforma células epiteliales en fibroblastos, e incluso promueve la diferenciación a miofibroblastos, los cuales se caracterizan porque, además de tener filamentos intermedios de vimentina y desmina, tienen  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), cadenas pesadas de miosina de músculo liso y sintetizan más colágena tipo I<sup>36</sup>. Por esto se ha asegurado que el TGF- $\beta 1$  es necesario, aunque no suficiente para promover fibrosis permanente<sup>37</sup>.

Entre los genes sobreexpresados en FPI, también se encuentran algunos que codifican para vías de señalización características del desarrollo embrionario, tales como Sonic hedgehog, gremlin 1 y algunos de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina. Con ello, se favorece la TEM y aumenta la resistencia que presentan los miofibroblastos a la apoptosis<sup>27, 35, 38</sup>. El comportamiento de los fibroblastos en la FPI también se ve modificado por cambios epigenéticos; por ejemplo, la hipermetilación del promotor del gen que codifica para el receptor Thy1 disminuye su transcripción, y así ya no puede actuar inhibiendo la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos<sup>27</sup>.

Otra característica observada en esta patología corresponde los niveles de expresión de 46 microRNAs, entre los que se encuentra un decremento de let-7d y miR29, así como un aumento de miR21, promoviéndose de esta manera la TEM y la expresión de genes profibróticos<sup>27</sup>.

Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la FPI. Dado que se trata de un desorden epitelial-fibroblástico, los antiinflamatorios no mejoran el estado de los pacientes. Una opción para algunos de ellos –menores de 55 años y sin complicaciones médicas— es el trasplante pulmonar (no realizado en México); lamentablemente, incluso en países desarrollados el periodo en lista de espera es de alrededor de dos años, por lo que la mayoría de los pacientes no son elegibles<sup>26</sup>.

En un ensayo de microarreglos realizado en 2008 por Pardo y cols., se identificó que el mRNA de la MMP-28 se encuentra sobreexpresado en FPI con respecto a pulmones controles (fig. 2)<sup>3</sup>. Este resultado originó la inquietud por estudiar dicha enzima y realizar la presente tesis, puesto que esta información no ha sido corroborada ni se conoce la localización de la proteína *in vivo*.



**Figura 2.** Análisis de microarreglos realizado con quince muestras pulmonares de pacientes con FPI y diez de controles, donde se representa con un círculo rojo (flecha azul), que la MMP-28 se encuentra sobreexpresada en dicha patología [Modificada de 6 (Pardo *et al.* 2008)].

## II. OBJETIVOS

- ❖ Corroborar los datos obtenidos por microarreglos que sugieren una sobreexpresión de la metaloproteinasas de matriz 28 (MMP-28 o epilisina) en muestras de tejido pulmonar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI), cuantificando su expresión génica mediante PCR en tiempo real.
- ❖ Identificar la localización de la proteína en tejidos pulmonares controles y de pacientes con FPI utilizando técnicas de inmunohistoquímica.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

**Población de estudio.** Utilizando biopsias de tejidos pulmonares controles y de pacientes con FPI, se estudió la expresión cuantitativa del transcrito de la MMP-28 y localización histológica de la proteína mediante qPCR e inmunohistoquímica, respectivamente. El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas”, proporcionó diez biopsias de tejido pulmonar de pacientes con FPI y una de pulmón *normal* (control). El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética y con el debido consentimiento informado de los pacientes. El diagnóstico de FPI se basó en el consenso de la Sociedad Americana de Tórax y de la Sociedad Europea Respiratoria (ATS/ERS) confirmada por biopsia pulmonar a cielo abierto. La muestra de pulmón control, considerada como pulmón normal, se obtuvo de una biopsia de paciente al que se le realizó una lobectomía para la remoción de un tumor pulmonar primario. Se obtuvieron otras dos muestras de RNA total de pulmón normal comprándolas a distintas compañías (*Stratagene*, La Jolla CA; *Ambion*, Austin TX).

Del mismo modo, el INER brindó cortes de pulmones *normales* (dos casos) y de pacientes con FPI (cuatro casos) embebidos en parafina. Asimismo, se hicieron ensayos de inmunofluorescencia con células de adenocarcinoma pulmonar A549, el modelo de estudio de neumocitos humanos más utilizado, no sólo de cáncer pulmonar. Estas células derivan del carcinoma de células alveolares de un hombre caucásico de 53 años y son fenotípicamente similares a los neumocitos tipo II<sup>39</sup>; además, está comprobado que sintetizan diferentes MMP, entre ellas la MMP-28<sup>3</sup>.

**Extracción y cuantificación de RNA total.** El RNA total se extrajo por la técnica del TRIzol Reagent (*Invitrogen*, Carlsbad CA). Brevemente: por cada 100 mg de tejido se agregó 1mL de TRIzol, se homogenizaron las muestras y enseguida se adicionaron 200µL

de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante tres minutos. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm (12500 x g) a 4 °C durante quince minutos. Terminado ese tiempo, fue posible observar las tres fases en la solución de cada tubo; la correspondiente al RNA (superior, fase acuosa), se trasladó a otro tubo estéril y se precipitó con 0.5 mL de isopropanol. Se incubó diez minutos a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C durante diez minutos. Se lavó con etanol al 75% y se volvió a centrifugar, ahora a 7500 rpm (7300 x g) durante cinco minutos. Se dejó secar y se resuspendió en 20 µL de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) al 0.1% (en adelante, agua DEPC). El mismo procedimiento se siguió con una caja de seis pozos con células A549, donde a cada pozo se agregaron 800 µL de TRIzol y se continuó con el protocolo. Enseguida, el RNA fue cuantificado en un NanoDrop (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE). La máxima absorbancia de los ácidos nucleicos ocurre a una longitud de onda de 260 nm (A260). El coeficiente de extinción del RNA es de 40.0, por lo que la concentración se calcula con la siguiente fórmula<sup>40</sup>:

$$[RNA]_{\mu g/\mu l} = \frac{A_{260} \times \text{dilución} \times 40.0}{1000}$$

Por experiencias previas en el laboratorio, no se determina la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa, puesto que la cantidad obtenida de los tejidos es muy poca, y tan valiosa que, se prefiere realizar directamente la RT-PCR y una PCR convencional para verificar la integridad del RNA (cDNA).

**Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR).** Para esta parte de la investigación se usó el RT-for-PCR Kit (*Clontech*, Mountain View CA), siguiendo las indicaciones del proveedor: 1 µg de RNA con 1 µL de solución

amortiguadora 10x para DNasa (*invitrogen*) y con 1  $\mu$ L de DNasa (*invitrogen*), se llevaron a 10  $\mu$ L con agua DEPC para incubar quince minutos a temperatura ambiente. Enseguida, se agregó 1  $\mu$ L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25 mM. Se incubó diez minutos a 65 °C para desnaturalizar la DNasa. A continuación se agregó 1  $\mu$ L de hexámeros al azar (Kit *Clontech*) y 1.5  $\mu$ L más de agua DEPC, se incubó dos minutos a 70 °C y antes de que bajara la temperatura se transfirió a hielo. Entonces, se añadió la mezcla de reacción (Kit *Clontech*): 4  $\mu$ L de solución amortiguadora 5x, 1  $\mu$ L de dNTPs, 0.5  $\mu$ L de inhibidor de RNasas y 1  $\mu$ L de Transcriptasa Reversa. Se mezcló gentilmente con la micropipeta y se llevó nuevamente al termociclador: 42 °C por una hora y 94 °C cinco minutos. Finalmente, se adicionaron 80  $\mu$ L de agua DEPC para tener una concentración teórica de cDNA 10ng/ $\mu$ L. Para corroborar que se haya obtenido el cDNA, se realizó una PCR convencional para amplificar un gen constitutivo, el de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH), con los siguientes oligonucleótidos específicos que generan un producto de 419 pb:

sentido            5'CCCCTTCATTGACCTCAACT3'

antisentido      5'TTGTCATGGATGACCTTGGC3'

La reacción se llevó a cabo con 2 $\mu$ L de cDNA, treinta ciclos de 94 °C 20", 60°C 20" y 72 °C 25". Para conocer el resultado, los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) al 2%.

**Curva patrón para PCR cuantitativa (qPCR).** Para elaborar curvas de diluciones seriales desde 10<sup>2</sup> hasta 10<sup>10</sup> copias/ $\mu$ L, tanto de MMP-28 como de rRNA 18s, se llevó a cabo una PCR de punto final con las mismas condiciones que se seguirían en la PCR en tiempo real, pero durante cuarenta ciclos, con cDNA de la línea celular A549. Los productos se separaron sometiéndolos a electroforesis en gel de agarosa (Sigma-Aldrich) al 1.5%. El amplicón fue purificado con columnas de filtración (Millipore, Billerica MA)

centrifugando a 6500 rpm (5000 x g) durante once minutos a 4 °C. Después de cuantificar el DNA con NanoDrop (*Thermo Scientific*), (El coeficiente de extinción del DNA es de 50.0<sup>40</sup>), se calculó la masa en gramos de cada amplificado (la longitud del producto correspondiente se multiplica por el peso promedio de un par de bases y se divide entre el número de Avogadro), para conocer cuántas copias/μL se obtuvieron de la purificación<sup>41</sup>. A partir de una solución con 10<sup>10</sup> copias/μL, se prepararon diluciones seriales hasta 10<sup>2</sup> copias/μL.

$$\frac{(\text{longitud del amplificado pb}) \times (660 \frac{\text{g}}{\text{mol}})}{6.022^{23} \text{ copias/mol}} = \text{masa de cada producto de PCR} \frac{\text{g}}{\text{copia}}$$

$$\text{Concentración de DNA copias/}\mu\text{L} = \frac{\text{Concentración de DNA purificado g/}\mu\text{L}}{\text{masa de cada producto de PCR} \frac{\text{g}}{\text{copia}}}$$

**PCR en tiempo real (cuantitativa).** Se realizó un análisis cuantitativo con sonda TaqMan (*Applied Biosystems*, Foster City CA) y curva patrón tanto de MMP-28 (con amplicón de 187 pb), como de rRNA 18s (con amplicón de 117 pb), se extrapoló el ciclo umbral (Ct) de cada muestra problema (pulmón control y con FPI), para calcular el número de copias de mRNA (cDNA) de las mismas. Los resultados se ponderaron dividiendo el número de copias/μL de MMP-28 entre el número de copias/μL de rRNA 18s de cada muestra.

La reacción se llevó a cabo con los siguientes reactivos (*invitrogen*): 1 μL de solución amortiguadora para PCR 10x, 0.4 μL MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.5 μL dNTPs 4mM, 0.1 μL TaqPlatinum, 5.5 μL agua DEPC y 0.5 μL de la sonda TaqMan 20x (*Applied Biosystems*) correspondiente, con 2 μL de cDNA. Se efectuó por cincuenta ciclos de 94 °C 15" y 60 °C

60", en el termociclador BioRad CFX96 y los datos de fluorescencia se analizaron con el software CFX Manager.

***Inmunohistoquímica.*** Se trabajó con un anticuerpo primario policlonal específico para MMP-28 (*Novus Biologicals*, Littleton CO) que reconoce un fragmento de la región tipo bisagra (298 - 312 aa). Se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado y se acopló posteriormente a estreptavidina conjugada con peroxidasa. El sustrato para la peroxidasa fue AEC (3-amino-9-etil-carbazol) que produce un precipitado rojo en las zonas del tejido que presentan la molécula de interés.

Los ensayos se realizaron como sigue: los tejidos embebidos en parafina se desparafinaron y rehidrataron 25 minutos en xilol y cinco minutos en etanol absoluto, etanol al 95% y etanol al 50%. Se lavaron con agua destilada diez minutos y se incubaron treinta minutos en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, para bloquear la peroxidasa endógena. Después se expuso el antígeno, poniendo las laminillas en solución amortiguadora de ácido cítrico pH 6.0, calentando en horno de microondas durante seis minutos a potencia seis y dos minutos a potencia cuatro. Las laminillas se dejaron enfriar y se incubaron en cámaras húmedas horizontales con bloqueador universal (*BioGenex*, San Ramon CA) durante 10 minutos. Posteriormente se incubó media hora en suero de borrego preparado a una dilución 1:100 en PBS. Enseguida se incubó con anticuerpo anti-MMP-28 (*Novus Biologicals*) en una concentración de 7.5 µg/mL a 4°C toda la noche (excepto el control negativo). Entre cada paso se lavaron las laminillas cinco minutos en PBS, desde que se bloqueó la peroxidasa endógena, hasta antes de incubar con suero.

Al siguiente día se reveló utilizando el Super Sensitive detection System (*BioGenex*): se enjuagaron en PBS con tween-20 al 1% (PBS + t) durante cinco minutos dos veces. Se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado (MultiLink) por 20 minutos. Se lavaron con PBS + t cinco minutos, dos veces más y se incubaron a

temperatura ambiente con estreptavidina conjugada con peroxidasa durante 20 minutos. Después de otro lavado en PBS + t, se reveló con AEC (1 gota de cromógeno AEC, en 2mL de agua destilada con 500  $\mu$ L de solución amortiguadora sustrato). Se contratiñó con hematoxilina sumergiendo las laminillas en agua y en bicarbonato de sodio 0.05 M para que los núcleos se colorearan de azul. Finalmente, los tejidos se cubrieron con una gota de cristal mount (*Biomed*) y con una gota de resina (*Clarion de Biomed*, Foster City CA), permitiendo el secado entre una y otra. Se tomaron fotografías con la cámara *Nikon DXM1200c* acoplada al microscopio *Nikon Eclipse E600* y con el software *NIS-Elements AR*.

***Inmunofluorescencia.*** Para este análisis se sembraron aproximadamente 20,000 células A549 (adenocarcinoma pulmonar) en cubreobjetos, se fijaron en paraformaldehído al 4% diez minutos. El protocolo se realizó a temperatura ambiente, excepto cuando se indica. Se lavaron con PBS tres veces durante dos minutos, se permeabilizaron con tritón x-100 al 0.5% durante diez minutos a 4 °C, para facilitar el acceso del anticuerpo al antígeno; enseguida se lavaron tres veces más con PBS durante 5 minutos y se añadió bloqueador universal (*BioGenex*) diez minutos. Luego de un lavado más en PBS, se incubaron con el anticuerpo primario una hora a 37 °C. Dos cubreobjetos se incubaron con el mismo anticuerpo anti-MMP-28 (*Novus Biologicals*) a una concentración de 15  $\mu$ g/mL, otros dos cubreobjetos se incubaron con el superpool anti-MMP-28 (*Triple Point Biologics*, Portland, OR), un conjunto de anticuerpos que reconocen diferentes dominios de la MMP-28, en concentración de 20  $\mu$ g/mL, y el control negativo se incubó con diluyente sin anticuerpo primario.

Se lavó con TBS con tween-20 al 0.1% por cinco minutos. Enseguida, las células a las que se añadió el anticuerpo de *Novus* se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína anti-conejo 1:200 (*Chemicon*, Temecula CA, fluorescencia verde);

mientras que las células a las que se añadió el de Triple Point, se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 555 anti-conejo 1:500 (*Cell Signaling Technology*, Danvers MA, fluorescencia roja), ambos durante 45 minutos, protegido de la luz. Se lavó con TBS con tween y con PBS cinco minutos; para la localización de los núcleos celulares, se incubaron dos minutos con 4',6-diamino 2-fenil-indol (DAPI, *invitrogen*) 300 nM, se lavó en PBS cinco minutos y se fijaron con 20 µL de medio de montaje Vectashield (*Cytocell*, United Kingdom). Se tomaron fotografías con el microscopio invertido modelo eclipse TE2000-5 (*Nikon*), con la cámara Digital Sight DS-U3 (*Nikon*) y con el software *NIS-Elements AR*.

**Búsqueda de secuencias de localización nuclear.** Una forma para predecir si una proteína puede entrar al núcleo celular es utilizar alguna herramienta que encuentre secuencias probables de localización nuclear (SLN)<sup>42</sup>. Con el fin de encontrar alguna(s), la secuencia de la MMP-28 fue sujeta a una búsqueda de SLN mediante los programas de software libre *Predict Protein* (Rost *et al.* 2004, [www.predictprotein.org](http://www.predictprotein.org)) y *NLStradamus* (Nguyen Ba *et al.* 2009, <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>).

**Análisis estadístico.** Los resultados de qPCR se compararon con el estadístico de prueba t de Student, buscando hallar valores de significancia entre la expresión génica de MMP-28 en muestras de pulmón control y fibrótico, puesto que se trata de comparar las medias de dos poblaciones independientes.

## IV. RESULTADOS

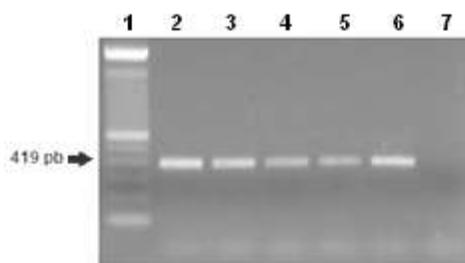
### Extracción y cuantificación de RNA total para RT-PCR

La concentración del RNA total extraído de cada muestra se presenta en la tabla 1. No se extrajo suficiente RNA de la quinta muestra, por lo que no se pudo utilizar en la síntesis de cDNA. Cabe aclarar que las muestras de RNA de pulmón normal compradas, no se incluyen pues ya vienen en una concentración de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Posteriormente se realizó la reacción de Transcripción Reversa para obtener el cDNA. Los resultados se corroboraron realizando una PCR convencional para amplificar el gen constitutivo de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En todos los casos el gen amplificó específicamente, correspondiendo al tamaño de producto esperado, lo cual significa que la síntesis de cDNA fue exitosa. En la fig. 3 se presenta el resultado de PCR de las primeras cuatro muestras.

**Tabla 1.** Cuantificación de RNA total y volumen necesario de muestra para tener  $1\mu\text{g}$  de RNA para la RT-PCR. \*La extracción de RNA de esta muestra no fue eficiente.

Tipo	[RNA] ng/ $\mu\text{L}$	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) para $1\mu\text{g}$
FPI	1037.0	0.96
FPI	1124.5	0.89
FPI	1060.1	0.94
FPI	950.6	1.05
*FPI	29.1	34.36
FPI	1260.0	0.794
FPI	3160.0	0.316
FPI	730.0	1.37
FPI	1710.0	0.58
FPI	901.0	1.11
PN	2280.0	0.439



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para observar productos de PCR para GAPDH (amplificación de 419 pb). El primer carril corresponde al marcador de 100 pb, del segundo al quinto es cDNA de cuatro de las muestras de pacientes con FPI, el sexto es un control positivo empleando cDNA de células A549 y el séptimo carril es control negativo.

## Curva patrón y PCR en tiempo real

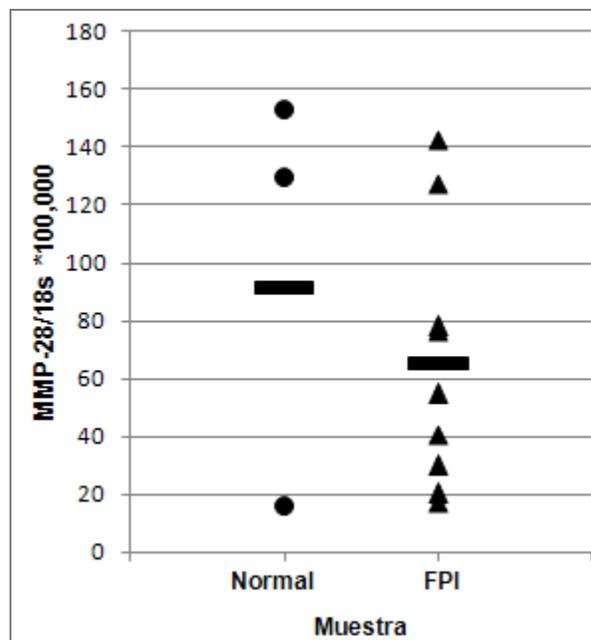
Se amplificaron y purificaron los cDNA para las curvas de PCR en tiempo real. De MMP-28 se obtuvieron 6.3 ng/ $\mu$ L y de rRNA 18s, 9.4 ng/ $\mu$ L. El amplificado de MMP-28 (117pb) pesa  $1.286^{-19}$  g/copia, mientras que el de rRNA 18s,  $2.0557^{-19}$  g/copia. De acuerdo con lo explicado en el método, corresponde a  $4.8989^{10}$  copias/ $\mu$ L de MMP-28 y a  $4.5727^{10}$  copias/ $\mu$ L de rRNA 18s. A partir de esta purificación se prepararon las curvas de referencia correspondientes, para calcular el número de copias de mRNA (cDNA) presentes en cada muestra. El experimento también se efectuó para el rRNA 18s con el fin de ponderar los resultados dividiendo el número de copias/ $\mu$ L del cDNA de la MMP-28 entre el número de copias/ $\mu$ L de rRNA 18s de cada muestra.

**Tabla 2.** Expresión de MMP-28 en pulmones controles (normales, N) y con FPI. Las mediciones del rRNA 18s y su desviación estándar ( $\sigma$ ) se presentan en notación científica ( $n \times 10^6$ ). Las mediciones del mRNA para la MMP-28 y su  $\sigma$  se muestran como  $n \times 10^4$ . En la última columna, la expresión de la MMP-28 ponderada contra el gen constitutivo de rRNA 18s está multiplicada por un factor arbitrario (cien mil) para facilitar el manejo de datos. De las muestras de pulmón control, la primera es la que proviene de una biopsia proporcionada por el INER y las otras dos son las compradas.

Muestra	18s $\times 10^6$	$\sigma$ 18s $\times 10^6$	MMP-28 $\times 10^4$	$\sigma$ MMP-28 $\times 10^4$	MMP-28/18s $\times 10^5$
N	5192.8	135.97	83.0	11.97	15.99
N	1826.0	266.83	279.1	18.44	152.89
N	431.9	6.16	56.0	3.61	129.58
FPI	2255.5	293.52	67.7	7.57	30.0
FPI	984.3	37.07	53.9	7.46	54.74
FPI	261.2	51.33	10.6	1.42	40.46
FPI	770.9	24.92	15.7	1.86	20.39
FPI	419.2	36.22	7.3	3.59	17.43
FPI	1592.9	32.47	124.3	11.49	78.04
FPI	251.2	37.77	35.8	3.75	142.45
FPI	51.0	12.17	6.5	2.12	127.51
FPI	5780.1	528.58	441.5	24.01	76.39

En la tabla 2 se presenta el número de copias/ $\mu\text{L}$  de los cDNA 18s y MMP-28, con sus respectivas desviaciones estándar ( $\sigma$ ); así como la expresión de MMP-28 ponderada por la división entre la expresión del gen constitutivo del rRNA 18s. Los resultados son promedio de un ensayo por triplicado.

No se observó diferencia entre la expresión de la MMP-28 en pulmones controles y en aquéllos con FPI. La media de los controles es de 99.4843 ( $\sigma=73.24$ ), mientras que la de fibróticos es incluso menor: 65.2668 ( $\sigma=45.26$ ). Para probarlo formalmente, las medias de cada categoría se compararon mediante el estadístico de prueba t de Student (2 grados de libertad, 95% de confianza), donde se confirmó que no hay diferencia significativa entre ellos. Los resultados se pueden apreciar de manera gráfica en la figura 4. Estos resultados, de manera inmediata, indican que la expresión transcripcional del gen para la MMP-28 es estadísticamente igual en FPI y en pulmón normal.



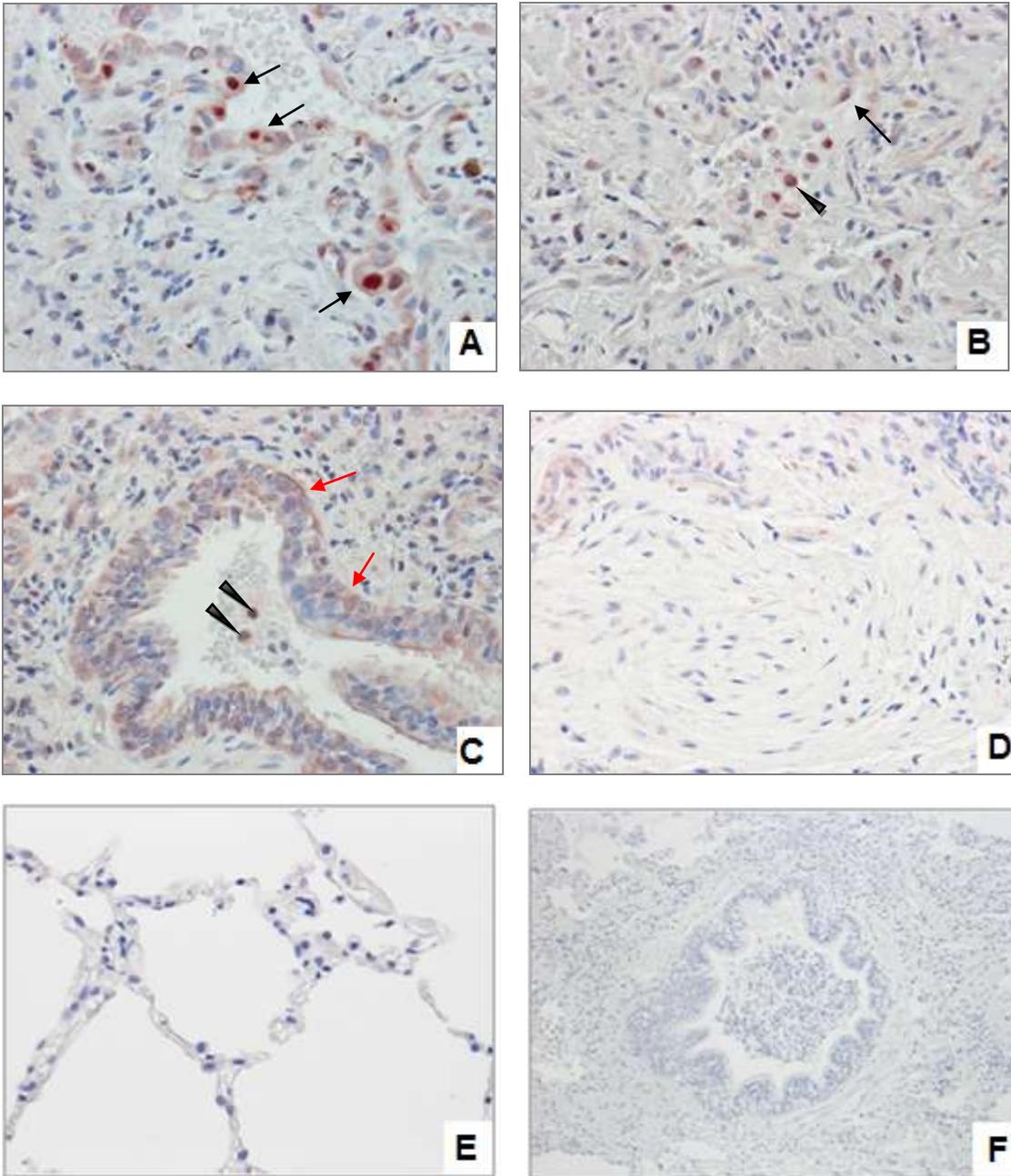
**Figura 4.** Expresión génica de MMP-28/18s en pulmones normales y con fibrosis pulmonar idiopática. La barra horizontal corresponde a la media de los valores de cada grupo.

### **Inmunohistoquímica**

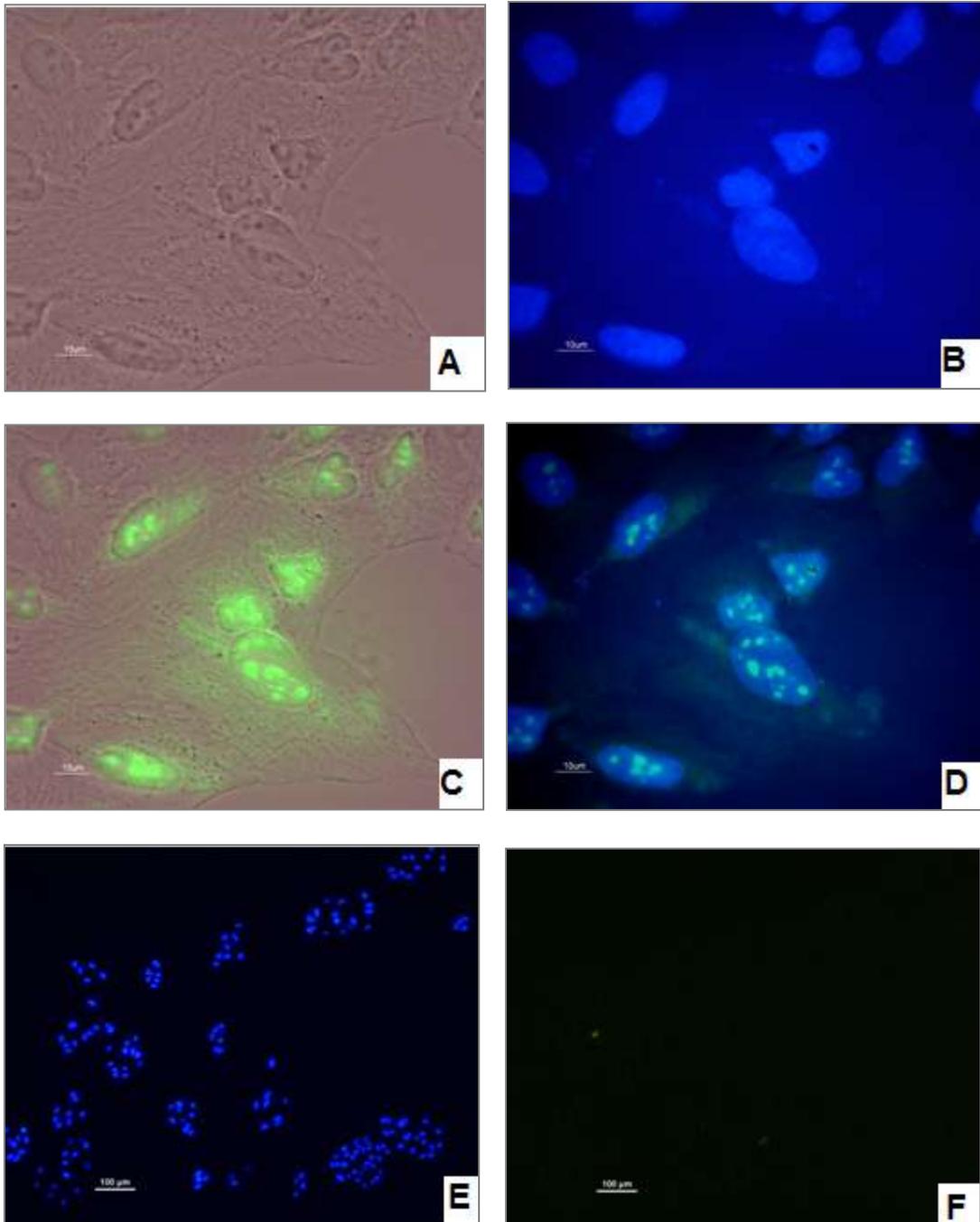
Por otra parte, en el ensayo de inmunohistoquímica, el anticuerpo contra la MMP-28 se utilizó en concentración de 7.5 µg/ml (dilución 1:150). El tiempo de revelado fue de siete minutos. En las laminillas de pacientes con FPI se encontró tinción positiva en los núcleos de células del epitelio alveolar (fig. 5A), tanto en neumocitos tipo I, como en neumocitos tipo II; al igual que se observó en citoplasma de células del epitelio bronquial (fig. 5C), en citoplasma de neutrófilos y en núcleos de macrófagos (fig. 5B). Los focos característicos de FPI no dieron tinción positiva (fig. 5D). Similarmente, el pulmón control tampoco dio tinción positiva (fig. 5E) en ningún tipo celular.

### **Inmunofluorescencia**

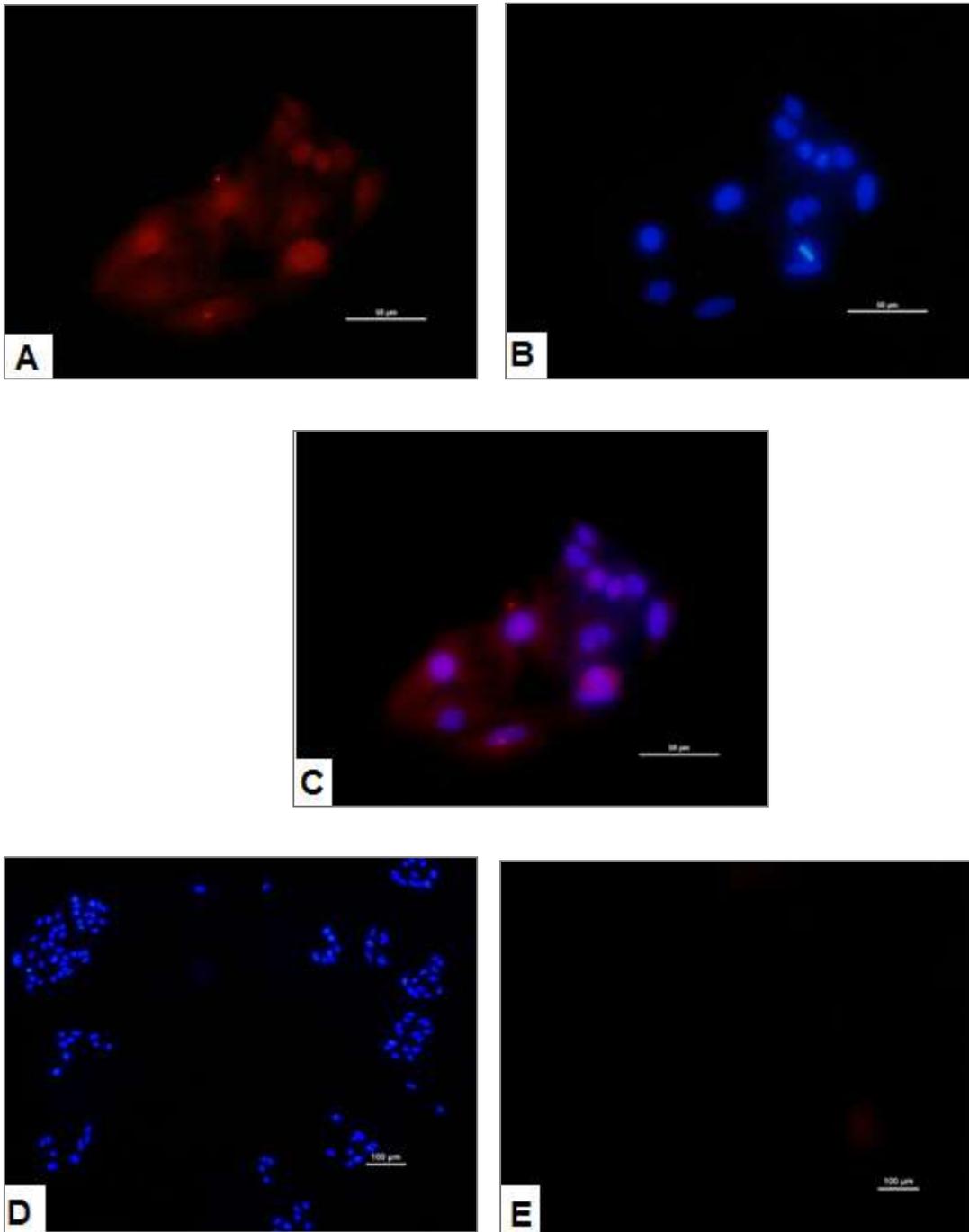
Para corroborar los resultados, se realizó inmunofluorescencia en células A549, con el mismo anticuerpo (*Novus Biologicals*); nuevamente, la marca positiva se observó principalmente en núcleos (fig. 6). Asimismo, se verificó que este resultado no se deba a un efecto falso positivo del anticuerpo, realizando inmunofluorescencia para las mismas células A549 con un conjunto de anticuerpos que identifican diferentes dominios de la MMP-28 (*Triple Point Biologicals*). Ahora, la marca positiva se observó además del núcleo, en citoplasma (fig. 7); y aunque en esta ocasión la técnica de inmunofluorescencia no se emplea de manera cuantitativa, es posible observar mayor tinción en núcleo que en citoplasma (este conjunto de anticuerpos no está recomendado para inmunohistoquímica, a pesar de ello se realizó el ensayo y no hubo tinción positiva en ningún caso).



**Figura 5.** Inmunohistoquímica de pulmones con FPI (A-D, F) y control (E). Tinción positiva para MMP-28 en núcleo de epitelio alveolar (flecha negra A, B) y macrófagos (cabeza de flecha B, C). Tinción positiva en citoplasma de epitelio bronquial (flecha roja C). No hay tinción en focos de fibroblastos (D) ni en pulmón *normal* (E). El control negativo no se incubó con anticuerpo primario (F). A-E son 40x, F es 10x.



**Figura 6.** Inmunofluorescencia para MMP-28 en células A549 con el anticuerpo anti-MMP-28 (*Novus Biologicals* 15  $\mu\text{g/ml}$ ). A. Contraste de fases. B. DAPI. C. MMP-28 con contraste de fases. D. Empalme de DAPI y MMP-28. E. DAPI en control negativo. F. En control negativo no hay marca para MMP-28. A-D 100x, barra = 10  $\mu\text{m}$ , E y F 10x, barra = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7.** Inmunofluorescencia de células A549 con anticuerpo anti-MMP-28 (*Triple Point Biologics* 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 555 (fluorescencia roja). A, tinción positiva en núcleo y citoplasma. B, DAPI. C, empalme de A y B. A-C 40x, barra = 50  $\mu\text{m}$ . D, DAPI en control negativo. E. En control negativo no hay marca para MMP-28. D y E 10x, barra = 100  $\mu\text{m}$ .

### **Búsqueda de secuencias de localización nuclear**

Tomando en cuenta la localización de la enzima observada en los ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, se decidió buscar en la secuencia de aminoácidos alguna SLN. La mayoría de las proteínas nucleares emplean un transporte mediado por acarreadores activos para entrar al núcleo, mientras que macromoléculas menores a los 40 kDa pasan por difusión pasiva a través de los poros nucleares. Tradicionalmente, el tráfico de proteínas hacia el núcleo está mediado por carioferinas o importinas que reconocen grupos de aminoácidos básicos en la proteína a ser transportada. Las secuencias de localización nuclear (SLN) clásicas son reconocidas por la importina  $\alpha$  (carioferina  $\alpha$  o Imp  $\alpha$ ), la cual a su vez se une a la importina  $\beta$  (carioferina  $\beta$  o Imp  $\beta$ ). Es el complejo trimérico (Imp  $\alpha$ , Imp  $\beta$  y cargamento) el que entra al núcleo<sup>42, 43</sup>.

Para predecir una SLN se utilizó la herramienta de software libre *Predict Protein*<sup>44</sup>, la cual analiza secuencias de aminoácidos y predice la estructura y función de las proteínas. El programa confirmó datos de la proteína que ya se conocían; por ejemplo, la secuencia señal que la caracteriza como proteína de secreción. Asimismo, encontró una secuencia de once aa como probable SLN que incluye a la secuencia típicamente reconocida por furina (fig. 8), enzima que, como se mencionó en la introducción, puede activar intracelularmente a algunas MMP. Asimismo, se empleó el programa NLStradamus que fue diseñado para encontrar SLN en levadura, y aunque se vio que en secuencias de vertebrados aumenta al doble la tasa de falsos positivos, los autores (Nguyen Ba y cols., 2009) argumentan que se puede utilizar con cierta cautela para analizar secuencias de otras especies<sup>43</sup>. Esta herramienta arrojó la misma secuencia más cuatro aa al final (secuencia de quince residuos de aminoácidos) (fig. 8).

---

MVARVGLLLRALQQLLWGHLDQAERGGQELRKEAEAFLEKYGYLNEQVPKAPTSTRFSDAIRAFQW	
VSQLPVSGVLDLDRATLRQMTRPRCGVTDTNSYAAWAERISDLFA	<b>RHRTKMR<b>RKKR</b>FAKQ</b>
LSYRLVNWPEHLPEPAVRGAVRAAFQLWSNVSALEFWEAPATGPADIRLITFFQGDHNDGLGNAFDGPG	
GALAHAFLLPRRGEAHFDQDERWSLSRRRGRNLFVVLAEIGHTLGLTHSPAPRALMAPYYKRLGRDAL	
LSWDDVLAVQSLSYGKPLGGSVAVQLPGKLFDFETWDSYSPQGRRPETQGPKYCHSSFDAITVDRQQQ	
LYIFKGSHFWEVAADGNVSEPRPLQERWVGLPPNIEAAAVSLNDGDFYFFKGGRCWRFRGPKPVWGLP	
QLCRAGGLPRHPDAALFFPPLRRLILFKGARYYVLARGGLQVEPYPRSLQDWGGIPEEVSGALPRPD	
GSIIFFRDRRYWRLDQAKLQATTSGRWATELPWMCWHANSGSALEF	
<b>PredictProtein</b>	112 - RHRTKMR <b>RKKR</b> -122
<b>NLStradamus</b>	112 - RHRTKMR <b>RKKR</b> FAKQ - 126

---

**Figura 8.** Secuencia de aminoácidos de la MMP-28. En el recuadro se presenta la SLN encontrada con la herramienta *Predict Protein* que coincide con la de *NLStradamus*. Abajo se marca con negritas los cuatro aa que clásicamente se manejan como sitio de reconocimiento por convertasas tipo furina.

## V. DISCUSIÓN

Tradicionalmente se solía describir a las metaloproteinasas de matriz (MMP) como enzimas cuya función principal es la degradación de los diversos compuestos de la matriz extracelular (MEC). Con los años se encontró que además son capaces de activar moléculas residentes de la MEC, como citocinas. Recientemente se ha demostrado que las MMP, aparte de desempeñar diversas funciones extracelulares, se pueden encontrar dentro de la célula e incluso dentro del núcleo, si bien sus funciones intracelulares aún no están completamente comprendidas.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva y frecuentemente letal en la que se han identificado varias MMP sobreexpresadas, tanto a nivel del transcrito como de la proteína, principalmente las MMP-1, -2, -3, -7 y -9. La mayoría son producidas por las células alveolares adyacentes a los focos de fibroblastos.

En términos generales, se considera que en esta patología dichas enzimas degradan la MEC facilitando la migración de células epiteliales –en especial MMP-1 y -7— y de fibroblastos, debido a la ruptura de membrana basal por parte de MMP-2 y -9, al tiempo que activan factores de crecimiento y quimiocinas profibrosantes<sup>3, 5, 45</sup>.

La MMP-7, además de activar osteopontina y otras MMP, libera el ectodominio de cadherina-E en epitelio respiratorio (en alveolos y tráquea) que ha sufrido daño, promoviendo la reparación del mismo. Asimismo, recientemente se identificó a la MMP-3 como inductor de la vía de señalización de  $\beta$ -catenina, probablemente también como consecuencia del corte a cadherina-E, induciendo TEM<sup>45, 46</sup>.

Del estudio de PCR en tiempo real se obtuvo que la expresión promedio de la MMP-28 no fue mayor en pulmones de pacientes con FPI que en pulmones controles, de hecho fue menor, aunque estadísticamente igual. La MMP-28 fue reportada como sobreexpresada en FPI; sin embargo, no está tan aumentada como otras MMP. En unidades arbitrarias, MMP-28 se encontró expresada alrededor del triple en FPI que en pulmones control (aprox. 90 vs 30; fig. 2); mientras que, por ejemplo, la MMP-7 se vio aumentada en toda una potencia (aprox. 700 vs 70)<sup>3</sup>. Revisando a detalle los datos de microarreglos complementados con ocho casos más de FPI y cinco más de controles, la MMP-28 no aparece sobreexpresada, dado que la media de expresión génica en pulmones control es de 1190.8 unidades arbitrarias, mientras que en pulmones de pacientes con FPI es de 1203.7 unidades arbitrarias<sup>49</sup>.

También es importante considerar que en general ha sido complicado encontrar características comunes para todos los pacientes de FPI, puesto que el comportamiento de la enfermedad es heterogéneo, ya han sido descritos algunos pacientes que sufren una “exacerbación aguda”, así como otro subgrupo que padecen la “variante acelerada”<sup>33</sup>; características que en la presente tesis, no se tomaron en cuenta. Estas consideraciones

podieron haber influido en el estudio, aunque también está la limitante de que el número de controles es bajo.

Cuando se dio a conocer a la MMP-28, se caracterizó como enzima producida en particular por los epitelios<sup>3,12</sup> –por ello el sobrenombre de epilisina— aunque posteriormente se descubrió sobreexpresada por células de tejido conjuntivo en osteoartritis y artritis reumatoide<sup>16, 17</sup>. Ya se había publicado su expresión proteica en citoplasma de células de Clara (epitelio bronquial) de ratones<sup>47</sup>; sin embargo, la presente tesis es el primer trabajo que da a conocer su localización en pulmón humano, en particular en el epitelio alveolar. Se encontró en las células epiteliales, específicamente en el núcleo del epitelio alveolar.

Illman y cols. en 2006, mostraron que la epilisina se une a la membrana plasmática de distintas líneas celulares epiteliales (A549, MDCK y A431), pero en ningún ensayo la observaron en núcleo<sup>4</sup>. Rodgers y cols. en 2009, ya habían identificado a esta metaloproteinasas en la periferia nuclear estudiando una línea celular de condrosarcoma<sup>20</sup>, pero ésta es la primera ocasión en que se observa completamente nuclear, inclusive en la línea celular A549 que ha sido utilizada en varios estudios de la misma enzima.

Tomando en cuenta que, en los ensayos de northern blot de los dos grupos de investigación que dieron a conocer a la MMP-28, se vio que sí se expresa en el pulmón adulto sano<sup>3, 12</sup>, al igual que se confirmó ahora mediante la qPCR, parece extraño que en el pulmón sin FPI no hubo tinción positiva para esta enzima en ningún tipo celular (fig. 5 E); además, llama la atención que ni siquiera se haya encontrado en leucocitos, puesto que se había visto que se expresa en linfocitos T y en macrófagos en condiciones normales<sup>47, 48</sup>. Claramente aquí, el número de controles también es una limitante.

A lo largo de los diez años que se lleva estudiando la MMP-28, ningún grupo de investigadores la había encontrado en el núcleo, como aquí se presenta en inmunohistoquímica; asimismo, el ensayo de inmunofluorescencia demuestra que la

MMP-28 efectivamente puede encontrarse en núcleo, como ha sido reportado para otras MMP en cáncer. Además de la MMP-2 en núcleo de endotelio arterial pulmonar de cerdo, esta la única MMP reportada con localización nuclear en pulmón.

El que no haya diferencias significativas indica que aproximadamente la misma cantidad de transcrito de MMP-28 se produce en pulmones con y sin FPI; sin embargo, el ensayo de inmunohistoquímica mostró que existe expresión proteica diferencial, puesto que se encontró ausente en pulmones controles, mientras que en FPI se vio en el epitelio alveolar. Estos datos sugieren una regulación diferencial en la síntesis de la proteína quizás debida a que en el pulmón normal el mRNA de epilisina no se traduce, quizás por miRNAs, o bien, la proteína recién sintetizada es degradada.

### **MMP en núcleo**

Particularmente, la MMP-28 se encontró en núcleo. Otras MMP localizadas en núcleo son las MMP-2, -3, -9, -11, -13 y -14. La MMP-2 puede encontrarse en las sarcómeras de cardiomiocitos humanos degradando troponina I<sup>50</sup>, y en núcleo en el mismo tejido; de ahí se purificó y se comprobó que es capaz de degradar una enzima reparadora de DNA, la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP-1) *in vitro*<sup>51</sup> e *in vivo* en neuronas, en las cuales también degrada al factor de reparación XRCC1 (X-ray cross-complementary factor 1) reclutado por PARP-1 durante la reparación por escisión de bases (BER)<sup>52</sup>.

Similarmente, la MMP-2 activa se identificó en núcleo y citosol de células endoteliales de arteria pulmonar de cerdo expuestas a humo de cigarro, donde posiblemente también fue responsable de un aumento de PARP-1 degradada<sup>53</sup>. La MMP-3 puede funcionar como factor transcripcional para el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), uniéndose a la secuencia enhancer TRENDIC<sup>54</sup>. También, en núcleo de hepatocitos y miofibroblastos en cáncer hepático, se vio una forma de la MMP-3 de 35kDa, cuya

estructura se desconoce, pero se sugiere que cuenta con funciones proapoptóticas dependientes de actividad catalítica<sup>55</sup>.

Algunas MMP se han localizado en núcleo de células nerviosas luego de isquemia cerebral. Por ejemplo, se vio MMP-13 en núcleo y citoplasma de oligodendrocitos de rata, así como en núcleo de neuronas cerebrales de humano como respuesta temprana al estímulo isquémico<sup>56</sup>. Kwan y cols. en 2004 también encontraron a la MMP-2 en núcleo de cardiomiocitos luego de isquemia de miocardio<sup>51</sup>. La isquemia es la disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo, lo cual se puede traducir en una baja presión parcial de oxígeno (fenómeno conocido como hipoxia), aunque también habría cierto decremento en el aporte de glucosa. Hay varios estudios que intentan relacionar la hipoxia particularmente con la FPI, sobretodo con la patogénesis temprana<sup>57, 58</sup>; sin embargo, ninguna ha sido considerada categórica.

Además, en núcleo de neuronas cerebrales isquémicas se identificó MMP-9 activa y en condiciones apoptóticas posteriores al estímulo isquémico MMP-2 activa colocalizando con MT1-MMP y furina<sup>52</sup>. MMP-2 y MT1-MMP también colocalizaron en núcleo de hepatocitos neoplásicos, sugiriendo que estas enzimas juegan cierto papel en la tumorigénesis del carcinoma hepatocelular<sup>59</sup>. Asimismo, la MT1-MMP se puede acumular alrededor del centrosoma y degradar a la pericentrina, proteína integral de centrosoma, esencial para la formación del huso mitótico, provocando inestabilidad cromosómica que puede llevar a cáncer<sup>60</sup>.

Ya se ha explicado la paradoja de apoptosis en la patogénesis de FPI, epitelio alveolar apoptótico y focos de miofibroblastos que parecen ser resistentes a ella<sup>30</sup>. En la presente tesis se exhibe la localización nuclear de la MMP-28 en el mismo epitelio alveolar. Este resultado coincide con la observación de MMP-2 en células apoptóticas por Yang y cols<sup>52</sup> (2010). Cabe recordar que se sugirió que la MMP-28 inicia una cascada de proteasas en la que participan MT1-MMP y MMP-9, que lleva a la degradación de

membrana basal<sup>10, 23</sup>. Aunque por supuesto, no se sabe si la función de la epilisina también sea pro-apoptótica.

En los casos mencionados hasta ahora, la MMP en núcleo aparentemente proviene del mismo tipo de splicing que la enzima secretada. No obstante, existe una isoforma de la MMP-11 o estromelisin 3 (la  $\beta$ -ST3) que se traduce directamente en la enzima activa, sin secuencia señal de secreción ni propéptido, capaz de degradar  $\alpha$ 1-antitripsina. El gen tiene dos promotores, y en ciertos casos la  $\beta$ -ST3 se transcribe, a partir de un residuo de metionina en el dominio catalítico<sup>61</sup>. En el caso de la MMP-28, sólo uno de los cinco residuos de metionina se localiza en el dominio catalítico y esto es después del sitio de unión a zinc; por lo que el tipo de splicing alternativo de la MMP-11 no aplica para la MMP-28. Sin embargo, ya se sabe que en el humano hay al menos tres transcritos distintos de 2.6, 2.0 y 1.2 kb [Diferentes a las formas encontradas en ratón, ausentes de 30 o 72 nucleótidos del séptimo exón<sup>21</sup>] <sup>3</sup>.

El transcrito más abundante en condiciones normales y en diversos órganos, incluyendo el pulmón, es el de 2.6 kb. Se ha sugerido que los otros dos corresponden a splicing alternativo, uno donde no se transcribe el cuarto exón, y otro en el que tanto el cuarto exón como el sexto están ausentes<sup>3</sup>. El cuarto exón codifica para la primera mitad del dominio catalítico, mientras que el sexto codifica para la primera parte del dominio tipo hemopexina. A pesar de ello, no se descarta la posibilidad de que uno de los transcritos mencionados, se traduzca en la proteína activa en el medio intracelular; por ejemplo, quizás sin el cuarto exón, el ion de zinc ya no pueda unirse al residuo de cisteína que mantiene a la enzima en condiciones normales como zimógeno. Cabe aclarar, que la cuantificación por qPCR teóricamente tomó en cuenta todos los transcritos presentes en las muestras, si es que hubiere más de un tipo, puesto que la sonda TaqMan empleada reconoce una sección entre el primer y segundo exón.

Aunque se han sugerido distintos papeles según el contexto celular, a la fecha no se han determinado cuáles son las funciones que esta enzima desempeña, ya sea en el medio extracelular o en el intracelular, menos aún en núcleo, puesto que no había sido descrita en él. Como ya se dijo, otras MMP encontradas en núcleo se han relacionado con apoptosis y/o con condiciones de hipoxia. En efecto, hay evidencias que indican que en FPI el epitelio alveolar se encuentra en estado apoptótico, por lo que la presencia de la MMP-28 en núcleo podría sugerir apoptosis. Sin embargo, también hay experimentos que sugieren que el epitelio alveolar podría encontrarse en estado senescente, puesto que en él se colocó a p53, p21, ciclina D1 y tinción positiva por reacción de beta-galactosidasa, marcadores de senescencia<sup>62</sup>. Por otra parte, la MMP-28 podría estar involucrada en la TEM bastante descrita en FPI y comprobada en células A549 que sobreexpresan MMP-28<sup>4</sup>, e incluso podría inducir un aumento en la migración e invasión celular como ha sido descrito en las mismas células<sup>4</sup> y en cáncer hepático<sup>18</sup>.

### **Secuencias de localización nuclear**

Las secuencias de localización nuclear (SLN) clásicas se encuentran en los extremos amino o carboxilo de las proteínas, entre dominios, o bien, en regiones flexibles tipo bucle<sup>42</sup>. Esta observación está a favor de que la SLN encontrada en la secuencia de MMP-28 efectivamente lo sea, pues se encuentra entre dos dominios: el prodominio y el catalítico, en una región accesible para convertasas tipo furina.

Sin embargo, la identificación exacta de SLN en proteínas es un predictor poco confiable del transporte nuclear por al menos dos razones. Primero, las SLN son cortas, pobremente definidas, tienden a coincidir por azar con secuencias que no son nucleares; y segundo, no se conocen todas, los patrones conocidos no abarcan a todas las proteínas nucleares o podrían no corresponder a la perfección con señales funcionales. A pesar de lo anterior, se recomienda que el primer paso para determinar si una proteína es nuclear y

no se encuentra en las bases de datos correspondientes, es utilizar alguna herramienta para intentar predecirlo, por ejemplo buscando SLN<sup>42</sup>.

En este trabajo se sugiere que la SLN encontrada al final del prodominio (fig. 8), que por cierto no se conoce en ninguna proteína nuclear, podría ser responsable de la translocación de la MMP-28 al núcleo del epitelio alveolar en FPI. Cabe mencionar que la SLN encontrada se localiza al final del tercer exón, es decir, está presente en los tres transcritos. No se sabe si la translocación a núcleo se relaciona con apoptosis inducida por hipoxia o por otros agentes, que es lo que la literatura insinúa.

El conocimiento preciso de las complejas interacciones, vías de señalización y mediadores que participan en el origen, desarrollo y mantenimiento de la FPI, podrá llevar al desarrollo de nuevas terapias; sin embargo, mientras no se conozcan, esta patología seguirá siendo objeto de intensa investigación.

## **VI. CONCLUSIONES**

- 1) En el análisis de expresión de la MMP-28 no se observaron diferencias significativas entre pulmones controles y aquéllos con FPI.
- 2) En las laminillas de pacientes con FPI se detectó que la MMP-28 tiene localización nuclear especialmente importante en el epitelio alveolar; a diferencia del pulmón control, donde no se observó tinción positiva.
- 3) Se observó a la MMP-28 en núcleo de células A549.

Los resultados invitan a estudiar la relación de la MMP-28 con el núcleo celular y, si existe una regulación diferencial para la misma en condiciones fisiológicas y patológicas (FPI) en pulmón humano.

## VII. REFERENCIAS

- 1 Pardo Semo A. y Selman Lama M. (2003). Matriz extracelular. Capítulo 17. En: Biología Celular y Molecular. Jiménez García L. F. y Merchant Larios H., coordinadores. *Pearson Educación*. México, pp. 515-545.
- 2 Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5<sup>th</sup> Ed. *Garland Sciences*. EEUU, pp. 375-452, 1193-1195.
- 3 Lohi J., Wilson C.L., Roby J.D., Parks W.C. (2001). Epilysin, a Novel Human Matrix Metalloproteinase (MMP-28) expressed in Testis and Keratinocytes and in Response to Injury. *J. Biol. Chem*, vol. 276 (13), pp. 10134–10144.
- 4 Illman S., Lehti K., Keski-Oja J., Lohi J. (2006). Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J Cell Sci*, vol. 119, pp. 3856–3865.
- 5 Selman M., Pardo A. (2008). The pathogenesis of pulmonary fibrosis. In: Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. Fourth Edition, vol. 1, chapter 26, *McGraw Hill*, pp. 371-383.
- 6 Pardo A., Selman M., Kaminski N. (2008). Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, vol. 40, pp. 1141–1155.
- 7 Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E. (2000). *Molecular Cell Biology*. 5<sup>th</sup> Ed. W.H. Freeman & Co. EEUU pp. 209-222.
- 8 Hadler-Olsen E., Fadnes B., Sylte I., Uhlin-Hansen L., Winberg J-O. (2011). Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS Journal*, vol. 278, pp. 28-45.
- 9 Sommerville R. PT., Oblander S. A. y Apte S. S. (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology*, vol. 4, pp. 216.
- 10 Illman S., Lohi J., Keski-Oja J. (2008). Epilysin (MMP-28) – structure, expression and potential functions. *Exp. Dermatol*, vol. 17, pp. 897–907.

- 11 Brew K. y Nagase H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1813, pp. 55-71.
- 12 Marchenko G.N. y Strongin A.Y. (2001). MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene*, vol. 265, pp. 87-93.
- 13 Lin M.-H., Liu S.-Y., Su H.-J., Liu Y.-Ch. (2006). Functional role of matrix metalloproteinase-28 in the oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, vol. 42, pp. 907– 913.
- 14 Gruber H. E., Ingram J. A., Hoelscher G. L., Zinchenko N., Norton H. J., Hanley E. N. Jr. (2009). Matrix metalloproteinase 28, a novel matrix metalloproteinase, is constitutively expressed in human intervertebral disc tissue and is present in matrix of more degenerated discs. *Arthritis Res Ther*, vol. 11(6):R184.
- 15 Saarialho-Kere U., Kerkela E., Jahkola T., Suomela S., Keski-Oja J., Lohi J. (2002). Epilysin (MMP-28) Expression is Associated with Cell Proliferation During Epithelial Repair. *J Invest Dermatol*, vol. 119, pp. 14-21.
- 16 Kevorkian L., Young D.A., Darrah C., Donell S.T., Shepstone L., Porter S., Brockbank S.M., Edwards D.R., Parker A.E., Clark I.M. (2004). Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum*, vol. 50, pp. 131-41.
- 17 Momohara S., Okamoto H., Komiya K., Ikari K. (2004). Matrix metalloproteinase 28/epilysin expression in cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: comment on the article by Kevorkian et al. *Arthritis Rheum*, vol. 50, pp. 4074–5; author reply 4075.
- 18 Jian P., Yanfang T., Zhuan Z., Jian W., Xueming Z., Jian N. (2011). MMP28 (epilysin) as a novel promoter of invasion and metastasis in gastric cancer. *BMC Cancer*, vol. 11, pp. 200.
- 19 Werner S. R., Mescher A. L., Neff A. W., King M. W., Chaturvedi S., Duffin K. L., Harty M. W., Smith R. C. (2007). Neural MMP-28 Expression Precedes Myelination During Development and Peripheral Nerve Repair. *Developmental Dynamics*, vol. 236, pp. 2852–2864.
- 20 Rodgers U. R., Kevorkian L., Surridge A. K., Waters J. G., Swingler T. E., Culley K., Illman S., Lohi J., Parker A. E., Clark I. M. (2009). Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-28. *Matrix Biol*, vol. 28(5-3), pp. 263–272.

- 21 Illman S., Keski-Oja J., Parks W.C., Lohi J. (2003). The mouse matrix metalloproteinase, epilysin (MMP-28), is alternatively spliced and processed by a furin-like proprotein convertase. *Biochem J*, vol. 375, pp. 191–197.
- 22 Pavlaki M., Zucker S., Dufour A., Calabrese N., Bahou W., Cao J. (2011). Furin Functions as a Nonproteolytic Chaperone for MatrixMetalloproteinase-28: MMP-28 Propeptide Sequence Requirement. *Biochemistry Research International*. Article ID 630319.
- 23 Heiskanen T.J., Illman, S.A., Lohi, J., Keski-Oja J. (2009). Epilysin (MMP-28) is deposited to the basolateral extracellular matrix of epithelial cells. *Matrix Biol*, vol. 28, pp. 74–83.
- 24 Munguía Reyes A. (2011). Mecanismos moleculares en el desarrollo de enfisema en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 25 Silverthorn D. U. (2009). Human Physiology: An Integrated Approach, 5<sup>th</sup> Ed. *Pearson Education Inc.* EEUU, pp. 518-570.
- 26 Gross T. J. y Hunninghake G. W. (2001). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*, vol. 345, No. 7, pp. 517-525.
- 27 King Jr. T. E., Pardo A., Selman M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *The lancet*. DOI: 10.1016/S0140-6736 (11)60052-4.
- 28 Meltzer E. B. y Noble P. W. (2008). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol.3: 8.
- 29 Selman M., King Jr. T. E., Pardo A. (2001). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann Intern Med*, vol. 134, pp. 136-151.
- 30 Thannickal V.J. y Horowitz J.C. (2006). Evolving Concepts of Apoptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, vol 3, pp. 350–356.
- 31 Xia H., Diebold D., Nho R., Perlman D., Kleidon J., Kahm J., Avdulov S., Peterson M., Nerva J., Bitterman P., Henke C. (2008). Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lungs fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, vol. 205, pp. 1659-1672.

- 32 Maher T.M., Evans I.C., Bottoms S.E., Mercer P.F., Thorley A.J., Nicholson A.G., Laurent G.J., Tetley T.D., Chambers R.C., McAnulty R.J. (2010). Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 182, pp. 73–82.
- 33 Selman M., Carrillo G., Estrada A., Mejia M., Becerril C., Cisneros J., Gaxiola M., Pérez-Padilla R., Navarro C., Richards T., Dauber J., King Jr. T. E., Pardo A., Kaminski N. (2007). Accelerated Variant of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical Behavior and Gene Expression Pattern. *PLoS ONE*, vol. 2(5): e482.
- 34 Ramos C., Montaña M., García-Alvarez J., Ruiz V., Uhal B.D., Selman M., Pardo A. (2001). Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 24, pp. 591–598.
- 35 Selman M., Pardo A., Barrera L., Estrada A., Watson S. R., Wilson K., Aziz N., Kaminski N., Zlotnik A. (2006). Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 173, pp. 188-198.
- 36 Willis B. C., Liebler J. M., Luby-Phelps K., Nicholson A. G., Crandall E. D., du Bois R. M., Borok Z. (2005). Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor-beta1, Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *AJP*, vol. 166, pp. 1321-1332.
- 37 Strieter R. M. (2008). What Differentiates Normal Lung Repair and Fibrosis? Inflammation, Resolution of Repair, and Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, vol. 5, pp. 305-310.
- 38 Selman M., Pardo A. y Kaminski N. (2008). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aberrant Recapitulation of Developmental Programs? *PLoS Medicine*. vol. 5, pp. 0373-0379.
- 39 American Type Culture Collection (ATCC). Consultado en: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-185&Template=cellBiology> octubre 2011.
- 40 Farrell R. E. Jr. (1998). RNA Methodologies, A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. 2<sup>nd</sup> Ed. *Academic Press. Hartcourt Brace & Company*, Publishers. EEUU, pp. 94-95.

- 41 Applied Biosystems (2003). Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR.
- 42 Marfori M., Mynott A., Ellis J. J., Medhi A. M., Saunders N. F. W., Curmi P. M., Forwood J. K., Bodén M., Kobe B. (2010). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1813, pp. 1562-1577.
- 43 Nguyen Ba A. N., Pogoutse A., Provart N., Moses A. M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, vol. 29; 10(1): 202, <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>.
- 44 Rost B., Yachdav G., Liu J. (2004). The Predict Protein Server. *Nucleic Acids Research*, vol. 32 (Web Server issue): W321-W326 <http://www.predictprotein.org>
- 45 Yamashita C. M., Dolgonos L., Zemans R. L., Young S. K., Robertson J., Briones N., Suzuki T., Campbell M. N., Gaudie J., Radisky D. C., Riches D. W. H., Yu G., Kaminski N., McCulloch C. A. G., Downey G.P. (2011). Matrix Metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, vol. 179, pp. 1733-1745.
- 46 McGuire J. K., Li Q. L., Parks W. C. (2003). Matrilysin mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol*, vol. 162, pp. 1831-1843.
- 47 Manicone A. M., Birkland T. P.M Lin M., Betsuyaku T., van Rooijen N., Lohi J., Keski-Oja J., Wang Y., Skerrett S. J., Parks W. C. (2009). Epilysin (MMP-28) Restrains Early Macrophage Recruitment in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *J Immunol*, vol. 182, pp. 3866-3876.
- 48 Bar-Or A., Nuttall R. K., Duddy M., Alter A., Jim H. J., Ifergan I., Pennington C. J., Bourgoin P., Edwards R. D., Yong V. W. (2003). Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain*, vol. 126, pp. 2738-2749.
- 49 Datos de expresión génica (resultados de microarreglos), número de acceso: GSE10667 en *Gene Expression Omnibus*, consultado en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/> octubre de 2011.

- 50 Wang, W., Schulze, C. J., Suarez-Pinzon, W. L., Dyck, J. R., Sawicki, G., & Schulz, R. (2002). Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation*, vol. 106, pp. 1543–1549.
- 51 Kwan J. A., Schulze C. J., Wang W., Leon H., Sariahmetoglu M., Sung M., Sawicka J., Sims D. E., Sawicki G., Schulz R. (2004). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *The FASEB Journal*, vol. 1, pp. 690-692.
- 52 Yang Y., Candelario-Jalil E., Thompson J. F., Cuadrado E., Estrada E. Y., Rosell A., Montaner J., Rosenberg G. A. (2010). Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, vol. 112, pp. 134–149.
- 53 Ruta A., Mark B., Edward B., Jawaharlal P., Jianliang Z. (2009). Nuclear localization of active matrix metalloproteinase-2 in cigarette smoke-exposed apoptotic endothelial cells. *Experimental Lung Research*, vol. 35, pp. 59-75.
- 54 Eguchi T., Kubota S., Kawata K., Mukudai Y., Uehara J., Ohgawara T., Ibaragi S., Sasaki A., Kuboki T. & Takigawa M. (2008). Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol*, vol. 28, pp. 2391–2413.
- 55 Si-Tayeb K., Monvoisin A., Mazzocco C., Lepreux S., Decossas M., Cubel G., Taras D., Blanc J. F., Robinson D. R., Rosenbaum J. (2006). Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol*, vol. 169, No.4, pp. 1390-1401.
- 56 Cuadrado E., Rosell A., Borrell-Pages M., Garcia-Bonilla L., Hernandez-Guillamon M., Ortega-Aznar A. y Montaner J. (2009). Matrix metalloproteinase-13 is activated and is found in the nucleus of neural cells after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 29, pp. 398–410.
- 57 Aquino-Gálvez A., González-Ávila G. (2010). El papel del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en la fibrosis pulmonar idiopática. *Neumol Cir Torax*, vol. 69, pp. 170-177.
- 58 Tzouvelekis A., Harokopos A., Paparountas T., Oikonomou N., Chatziioannou A., Vilaras A., Tsiambas E., Karameris A., Demosthenes Bouros D., Aidinis V. (2007). Comparative Expression Profiling in Pulmonary Fibrosis Suggests a Role of Hypoxia-inducible Factor-1a in Disease Pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 176, pp. 1108–1119.

- 59 Ip Y.C., Cheung S. T. & Fan S. T. (2007). Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*, vol. 46, pp. 225–230.
- 60 Golubkov, V. S., S. Boyd, A. Y. Savinov, A. V. Chekanov, A. L. Osterman, A. Remacle, D. V. Rozanov, S. J. Doxsey, and A. Y. Strongin. (2005). Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) exhibits an important intracellular cleavage function and causes chromosome instability. *J Biol Chem*, vol. 280, pp. 25079–25086.
- 61 Luo, D., Mari, B., Stoll, I., & Anglard, P. (2002). Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 25527–25536.
- 62 Medina Pérez D. M. (2009). Evaluación de marcadores de senescencia en fibrosis pulmonar idiopática. Tesis, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.