



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Regulación epigenética de MMP-1 en fibroblastos de pulmón  
normal y de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**ANA LAURA GÓMEZ ROSAS**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA  
2012**



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 del alumno

Nombre: Gómez

Rosas

Ana Laura

Teléfono: 15 09 18 60

Universidad Nacional Autónoma de México

Biología

303273262

2. Datos del tutor

Dr.

José Guadalupe

Cisneros

Lira

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Annie

Pardo

Semo

4. Datos del sinodal 2

Dra.

María de Lourdes

Segura

Valdez

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Jorge Antonio

García

Álvarez

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Criselda

Mendoza

Milla

7. Datos del trabajo escrito

Regulación epigenética de MMP-1 en fibroblastos de pulmón normal y de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.

42 p.

2012

A mi papá con cariño.

## Agradecimientos

Antes que nada me gustaría agradecer a mi familia que sé que siempre están aquí. En especial me gustaría agradecer a mi papá Ricardo Gómez Labastida que me ha dado una vida maravillosa, que me ha dado todo lo que necesite y más, y a quien admiro muchísimo por lo generoso y buen padre que es además de trabajador y muy tenaz en todo lo que hace. A mi mamá Cecilia Rosas a quien quiero mucho y le estoy muy agradecida por todo lo que me ha enseñado. Muchas gracias por todo su apoyo, comprensión y esfuerzo, por todos los sacrificios que han hecho para que yo me supere gracias no los defraudaré.

A mis hermanitas Viridiana y Alicia gracias por darme momentos inolvidables de risas, tristezas y enojos pero sobre todo por su cariño, apoyo y comprensión. ¡¡¡Siempre juntas!!!

A mi Ivancito quien llego a mi vida sorpresivamente y quien ha querido seguir a mi lado.

A mi Conejo, Galleta, y Rex por darme tantos momentos de desestrés y porque el cuidarlos me hace tan feliz.

A mis amigas de siempre Zaidi y Dulce porque sé que estarán ahí en cualquier momento que las necesite. A mis amigos de la carrera Elisa, Cintita, Anel, Aurea y Fany. A mi buen amigo Miguel Negreros a quien siempre le preguntaba y preguntaba y siempre estaba dispuesto ayudarme. A Miguel Cid quien me hizo muy divertido los tiempos del laboratorio y a ver todo con calma.

A Reme y a Jorge quienes me dieron las bases y me despertaron el interés por el laboratorio a Jorge por ayudarme siempre.

A todos los miembros del laboratorio de fibrosis pulmonar del INER al Doctor Carlos Ramos, a Martha, Carina, Criselda, Ily, Marco y Víctor por su calidez y sus atenciones conmigo muy especialmente a mi tutor el Doctor José Cisneros: pepe gracias por toda la paciencia que me tuviste que fue mucha, porque me enseñaste a trabajar, a ser ordenada y la importancia de anotar todo pero lo más importante por ser un buen amigo y por darme tu apoyo.

A mis sinodales: Dra. Annie pardo, Dra. Lourdes Segura, Dra. Criselda Mendoza y al Dr. Jorge García. Ya que sin sus correcciones este trabajo no se hubiera enriquecido

## Índice.

	Página
Abreviaciones.....	1
Resumen.....	3
Introducción.....	4
Matriz extracelular pulmonar.....	4
Fibroblastos.....	5
Metaloproteasas de matriz extracelular (MMP's).....	6
Regulación de MMP's.....	8
Cromatina.....	10
Modificación de histonas.....	11
Acetilación de histonas.....	13
Deacetilación de histonas.....	15
Antecedentes.....	17
Fibrosis pulmonar.....	17
Colagenasa intersticial (MMP-1).....	18
Justificación.....	21
Objetivos.....	22
Métodos.....	23
Cultivo de fibroblastos.....	23
Tratamientos de células.....	23
Obtención de medios condicionados y RNA.....	24
Cuantificación de proteínas.....	24
Síntesis de cDNA.....	25
Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR).....	25
Western Blot.....	26
Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	26
PCR para el promotor de la MMP-1.....	28
Resultados.....	30
Expresión génica de MMP-1 en fibroblastos de pulmón normal y de pulmón con FPI.....	30
Niveles de MMP-1 en medios condicionados.....	31
Análisis del estado de acetilación del promotor de la MMP-1.....	32
Discusión y conclusiones.....	35

Referencias..... 39

## ABREVIATURAS

AP-1: Proteína activadora 1

ATS: Sociedad Americana de Tórax

CD44: Glicoproteína de membrana

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina

CoREST: Co-represor transcripcional

CT: Ciclo umbral

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EPID: Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa

ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares

FPI: Fibrosis pulmonar idiopática

Gly: Glicina

GNATs: N-Acetiltransferasa emparentada con *Gen5*

HATs: Histona acetiltransferasa

HDACs: Deacetilasa de histona

HMT: Histona metiltransferasa

HP-1: Proteína de heterocromatina-1

IGFBP: Proteína de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina

IL-1: Interleucina-1

IP-10: Proteína de 10KDa inducida por Interferón-gamma.

MAPK: Cinasa activada por mitógenos

MEC: Matriz extracelular

Mi2/NuRD: Complejo con actividad de deacetilasa de histona y ATPasa

MMP: Metaloproteinasas de matriz extracelular

MMP-1: Colagenasa intersticial-1

MT-MMP: Metaloproteasas de membrana

MYSTs: Moz, YBF2/SAS3, SAS2 and Tip60.

N-CoR: Co-represor nuclear

NF- $\kappa$ B: factor nuclear kappa  $\beta$

P300/CBP: Co-activador transcripcional

Pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

SDS: Dodecilsulfato sódico

SNP: Polimorfismo de nucleótido sencillo

SUV39H1: enzima metiltransferasa de histonas

SWI/SNF: Complejo remodelador del nucleosoma (SWItch/Sucrose Non Fermentable)

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante-beta

TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteinasas

TNT- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral-alfa

TSA: Tricostatina A

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

## RESUMEN

Una característica de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la formación de focos de fibroblastos y el depósito exagerado de fibras de colágeno en el intersticio del pulmón. La MMP-1 es la enzima responsable de la degradación de la colágena y existen reportes de que los fibroblastos de estos focos no expresan esta enzima. Una posible causa de que la MMP-1 no se exprese en estas células es que la cromatina se encuentre en un estado compactado que impida el acceso a la maquinaria de transcripción. La organización de la cromatina vía modificación de histonas tiene impacto directo en la expresión y o represión de genes. En general, la acetilación de las histonas se asocia con un ambiente propicio para la transcripción mientras que la deacetilación reprime la transcripción. El objetivo de este trabajo fue investigar si la expresión de MMP-1 en fibroblastos de pulmón se encuentra regulada por la acetilación de histonas. Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de un paciente diagnosticado con FPI y un cultivo de fibroblastos normales. Las células se mantuvieron durante 24 horas en medio de cultivo solo o con Tricostatina A (300 nM), un inhibidor de deacetilasas de histonas. Se analizó la expresión de MMP-1 por PCR en tiempo real y por inmunoblot. Se utilizó un ensayo de ChIP y posteriormente una amplificación por PCR para determinar si la región del promotor de la MMP-1 se asocia o no a histonas acetiladas. Los niveles de expresión génica de MMP-1 fueron menores en los fibroblastos de FPI en comparación con los normales; sin embargo en los fibroblastos de FPI el nivel de MMP-1 aumenta casi 2.5 veces al ser tratados con Tricostatina A. A nivel de proteína estos resultados se mantienen ya que se encontró que a nivel basal los fibroblastos de pacientes con FPI secretan menos MMP-1 en comparación con los normales. El tratamiento con TSA incremento la producción de MMP-1 pero en FPI el incremento fue del 61% mientras que en los normales es de 13.2%. La amplificación por PCR de las muestras que fueron inmunoprecipitadas muestra que la mayor parte del promotor de la MMP-1, que corresponde a los nucleótidos que van de -571 a -3533, se encuentra en estado deacetilado en los fibroblastos de FPI. Los resultados sugieren que en los fibroblastos de FPI la disminución de MMP-1 puede ser debida en parte a que en la región donde se encuentra este gen predomina un ambiente de represión transcripcional generado por histonas deacetiladas.

## INTRODUCCIÓN

### **Matriz extracelular pulmonar.**

Se denomina matriz extracelular (MEC) al complejo de proteínas y carbohidratos que se encuentran fuera de la célula en los tejidos de organismos multicelulares. La MEC funciona como un medio de soporte mecánico y estructural para las células que conforman un tejido y debido a que interacciona con diferentes moléculas como factores de crecimiento, moléculas de anclaje y reconocimiento, desempeña un papel importante en procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la migración y la muerte celular. La cantidad y composición de MEC varía de acuerdo con el órgano en el que se encuentre; así en la piel, cartílago, tendón y hueso es un componente muy abundante, mientras que en el cerebro y la médula espinal es muy escaso. En los animales, las proteínas más abundantes de la MEC son las colágenas, que confieren resistencia mecánica y en menor medida la elastina que le confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad. También se encuentran otras proteínas como fibronectinas, tenacinas, laminina, entactina y proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad (1).

En el pulmón, la MEC está formada principalmente de colágena y elastina en forma de fibras y las colágenas representan el 20% del peso seco. El 75% de las proteínas que forman la MEC del intersticio pulmonar son colágenas fibrilares tipos I y III. En esta matriz se encuentran varios tipos celulares incluyendo fibroblastos, mio-fibroblastos y pericitos. La membrana basal del pulmón es un tipo especializado de MEC y está compuesta principalmente de colágena tipo IV, además de laminina, heparán sulfato, fibronectina, nidógeno y otros proteoglicanos. En la zona alveolo capilar donde ocurre el intercambio de

gas, la matriz extracelular está formada por colágenas de tipo I y III, elastina, proteoglicanos y fibronectina (1, 2).

### **Fibroblastos.**

Los fibroblastos representan el tipo celular más abundante en los tejidos conectivos no cartilagosos, tienen forma fusiforme o de huso, con un diámetro pequeño de 26  $\mu\text{m}$  y se distinguen porque en su citoesqueleto expresan vimentina y actinas F,  $\beta$  y  $\gamma$ . Tienen a su cargo la producción de moléculas y el remodelado de la matriz extracelular. En cuanto a las moléculas que sintetizan se encuentran varios miembros de la familia de las colágenas, principalmente los tipos I y III, fibras elásticas, proteoglicanos, fibronectina y glicoproteínas. Los fibroblastos también producen proteasas de la familia de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), tales como la colagenasa intersticial (MMP-1) y la gelatinasa A (MMP-2), además de los inhibidores tisulares de estas enzimas, llamados TIMP's.

Los miofibroblastos son una subpoblación de fibroblastos con prolongaciones que le confieren una forma estrellada, son más grandes que los fibroblastos, presentan un diámetro de 38  $\mu\text{m}$  y en su citoesqueleto expresan proteínas como  $\alpha$ -actina de músculo liso, desmina y miosina. Los mio-fibroblastos presentan un fenotipo de célula secretora activa, con abundante retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias, vacuolas y ribosomas. Secretan diferentes MMPs, como la MMP-1 y 3, TIMP's y son células que producen grandes cantidades de colágena, en particular la colágena tipo I (3,4).

Los fibroblastos y mio-fibroblastos interactúan con las diferentes células locales e inflamatorias a través de mediadores químicos como las interleucinas, quimosinas,

neuropéptidos y diversos factores de crecimiento, además de que mantienen una estrecha relación con la MEC por medio de contactos membranales focales vía integrinas.

### **Metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs).**

Las MMPs conforman una sub-familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc y calcio que pertenecen a la súper familia de enzimas agrupadas como metzincinas. Las MMPs son secretadas como zimógenos en estado inactivo y se encargan de la degradación de las proteínas que conforman la MEC así como de otros sustratos que no son de la matriz. Las MMP's participan en numerosos procesos biológicos relacionados con el desarrollo embrionario, morfogénesis de órganos, angiogénesis, reparación de tejidos, y colaboran activamente en procesos celulares fundamentales como la migración y apoptosis (5,6). En el humano se han descrito 24 genes pero solo 23 proteínas, sin embargo no son exclusivos de vertebrados ya que se han descrito en erizo de mar, *Drosophila melanogaster*, hidra, virus, bacterias, nemátodos y en plantas. Todos estos genes son similares en estructura, mecanismos de catálisis y regulación; presentan un alto porcentaje de homología y se piensa que divergen de un solo péptido señal y de ahí evolucionaron (7).

Todas las MMP presentan una secuencia de péptido señal, un pro-péptido y un dominio catalítico. El péptido señal contiene la secuencia para la secreción de la enzima. El pro-péptido tiene de 80-90 residuos de aminoácidos y un residuo de Cys dentro de una secuencia altamente conservada PRCGXXPD y se encarga de mantener a la enzima inactiva. El dominio catalítico tiene un sitio activo con una secuencia conservada HEXXHXXGXXH que contiene la región de unión al  $Zn^{2+}$ , característica presente en todos los miembros de la súper familia de las metzincinas. La mayoría de las MMPs poseen un

dominio tipo hemopexina en el extremo carboxilo-terminal que sirve como secuencia para el reconocimiento del sustrato y para la interacción con sus inhibidores y se conecta con el dominio catalítico por una región rica en prolina denominada bisagra (5, 7,8).

Basados en su estructura, las MMPs se clasifican en varios grupos (Tabla 1). En el grupo de las colagenasas se incluyen a la MMP-1, MMP-8, y MMP-13 las cuales pueden degradar colágenas fibrilares (tipo I, II, III) con dominio de triple hélice. Las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), degradan principalmente la colágena tipo IV en membranas basales y colágena desnaturalizada. Poseen un dominio adicional con 3 secuencias similares a fibronectina en el dominio catalítico que participan en el reconocimiento y la unión de la enzima con el sustrato. Las matrilisinas MMP-7 y MMP-26 poseen afinidad por varios sustratos, principalmente fibronectina. Se caracterizan porque han perdido el dominio carboxilo-terminal y sólo poseen el propéptido y el dominio catalítico. La MMP-3, MMP-10 y MMP-11 conforman el grupo de las estromelinas y entre sus sustratos se encuentran proteínas como la fibronectina, laminina y agrecano entre otros. La MMP-11 presenta una secuencia similar a furina entre el propéptido y el dominio catalítico lo que permite que la enzima se pueda activar intracelularmente. Las metaloproteasas de membrana (MT- MMP): es un grupo integrado por (MT1, MT2, MT3 y MT5) Su característica es el anclaje de la enzima a la superficie celular, tienen un dominio transmembrana y un motivo tipo furina el cual permite que la proenzima se active intracelularmente. Presentan una gran variedad de posibles sustratos, entre ellos se encuentran colágenas intersticiales, gelatina, fibronectina (9,10).

Tabla 1. Clasificación de las metaloproteasas de matriz extracelular.

Subgrupo	MMP	Nombre	Sustratos
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa 1	Colágenas I,II, III, VII, X, gelatina, entactina, agregano, tenascina y perlecan
	MMP-8	Colagenasa 2	
	MMP-13	Colagenasa 3	
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A	Colágena IV, V, gelatina, elastina, decorina, fibronectina, pro-TGF $\beta$ , pro- ILI - $\beta$ , Pro-TNF- $\alpha$
	MMP-9	Gelatinasa B	
Estromelisinias	MMP-3	Estromelisinina 1	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, gelatina, fibrinógeno, entactina, pro- ILI - $\beta$ , pro-EGF, Pro-TNF- $\alpha$ , IGFB
	MMP-10	Estromelisinina 2	
	MMP-11	Estromelisinina 3	
Matrilisinias	MMP-7	Matrilisinina 1	Laminina, prodefensina, osteopontina, decorina, gelatina, fibronectina, colágenas III, IV, V, IX, X, XI, fibrinógeno y proteoglicanos.
	MMP-26	Matrilisinina 2	
MT- MMPs	MMP-14	MT1-MMP	Gelatina, fibronectina, vitronectina, colágena IV, proMMP-2, CD44
	MMP-15	MT2-MMP	
	MMP-16	MT3-MMP	
	MMP-17	MT4-MMP	
	MMP-24	MT5-MMP	
	MMP-25	MT6-MMP/leucolisina	
Otras MMPs	MMP-12	Metaloelastasa	Elastina, plasminógeno, fibronectina, tenascina, fibronectina, amelogenina, agregano.
	MMP-19	RASI	
	MMP-20	Enamelisina	
	MMP-23	CA-MMP	
	MMP-27		
	MMP-28	Epilisina	

### Regulación de MMPs.

La actividad de las MMPs se puede regular a nivel transcripcional y post-transcripcional, a nivel de activación de la pro-enzima y por su inhibición local en el espacio celular por la interacción con los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP's) (11).

Las MMPs se regulan a nivel de activación transcripcional y elementos del promotor a través de una variedad de factores estimuladores y supresores que influyen en varias vías de señalización. Muchas MMPs no se expresan en condiciones normales; sin embargo, su expresión se puede modificar debido a la acción de citosinas y factores de crecimiento como TGF-B, IL-1, VEGF, PDGF y otras moléculas presentes en condiciones patológicas.

A nivel de promotor, varias señales extracelulares y vías de transducción convergen en el factor de transcripción AP-1 que incluye miembros c-jun y c-fos, los cuales modulan la expresión y/o activación de genes cuando forman homo o heterodímeros. El sitio de unión de este factor se encuentra en la región promotora de la mayor parte de los genes de las MMPs (11,12). Otro mecanismo de regulación es a nivel de activación debido a que estas enzimas son secretadas en su forma inactiva. En esta forma de zimógeno, el residuo de Cys en el propéptido se encuentra unido al Zn catalítico. Para que estén activas, este enlace debe separarse por un cambio conformacional o proteólisis y entonces el propéptido es liberado. A este proceso se le conoce como “switch de cisteína” (11). Esta activación también puede ser por medio de otras proteasas *in vitro* y se puede inducir por la acción de agentes químicos con grupo tiol modificados o mediante la acción de detergentes como el SDS (5).

En el espacio extracelular, la actividad de las MMPs se puede regular por los TIMP's. La familia de los TIMP's cuenta con cuatro miembros del TIMP-1 al TIMP-4. Son proteínas pequeñas de 20 a 29 KD que tienen características similares en su estructura pero son distintos en sus propiedades bioquímicas, patrones de expresión y preferencias de asociación con los diferentes miembros de las MMPs. Los TIMP's tienen la capacidad de inhibir a las MMPs formando un complejo enzima-inhibidor 1:1. TIMP-1 se une preferentemente a la MMP-1 mientras que TIMP-2 tiene mayor afinidad con MMPs del grupo de las gelatinasas (5, 11). Otro aspecto importante de la regulación transcripcional es a nivel de la organización de la cromatina que participa en la regulación de la expresión de un gen. La organización ultra-estructural del DNA y las proteínas histonas determina en gran medida la expresión de genes como los de las MMPs.

## **Cromatina.**

En los eucariontes el DNA se almacena en el núcleo y debido a que es una molécula muy larga, es necesario plegarlo para almacenarlo en un espacio tan pequeño. Para ello, el DNA se asocia con diferentes proteínas que permiten su compactación en una estructura denominada cromatina. Las características ultra-estructurales de la cromatina fueron dilucidadas en su totalidad en la década de los 70's y en esos años se consideraba como una estructura esencialmente estática, homogénea e inerte. Sin embargo, la cromatina no es una estructura estática, sino variable y dinámica, que participa en la regulación de los procesos de replicación, transcripción y reparación del DNA (13).

El nucleosoma es la unidad fundamental en la estructura de la cromatina y está formado por DNA genómico (147 pb) que se enrollan en 2 giros alrededor de un octámero de proteínas básicas llamadas histonas. Este octámero está formado por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Los nucleosomas se unen entre sí a través de 10-80 pares de bases de DNA formando una fibra de 11nm o collar de perlas. La incorporación de la histona H1 en el DNA internucleosomal favorece la formación del solenoide o fibra de 30 nm que constituye el estado de empaquetamiento más abundante en interfase. El solenoide (formado por 6 nucleosomas), se compacta en fibras de 300 nm llamadas asas hasta alcanzar el grado máximo de compactación cuando se forma el cromosoma metafásico. El grado de compactación de la cromatina determina en gran medida el acceso a la maquinaria transcripcional y por ende puede regular la expresión de genes (14).

En el núcleo de la célula existen regiones donde la cromatina se encuentra en un estado de mayor compactación denominado heterocromatina. En estos sitios se dificulta la

interacción entre el DNA y los factores de transcripción por lo cual son consideradas como zonas de transcripción inactivas. Por el contrario, la eucromatina que representa las zonas donde la cromatina se encuentra en un estado más laxo representan zonas transcripcionalmente activas. Las variaciones entre un estado laxo o compacto se deben a que los componentes de la cromatina pueden sufrir diferentes modificaciones generando estados transitorios de “remodelación de cromatina”, siendo las más importantes aquellas que ocurren a nivel del nucleosoma, en especial las modificaciones covalentes en las colas (regiones N- terminales) de las histonas son de las más estudiadas y tienen un efecto directo en la compactación de la cromatina y por ende en la función de la maquinaria de transcripción (15). Adicionalmente, el estado de la cromatina también se regula a través de alteraciones en la composición y variantes de histonas, cambios en la composición de proteínas no histonas y alteraciones producidas por enzimas “remodeladoras de cromatina” dependientes de ATP, a la cual pertenecen diferentes complejos multiproteicos de las familias SWI/SNF, ISWI y Mi2/NuRD (16).

### **Modificación de Histonas.**

Las histonas son proteínas evolutivamente muy conservadas, pequeñas y tienen un alto contenido de residuos de lisinas y argininas, lo que les confiere un carácter fuertemente básico. Desde el punto de vista estructural las histonas tienen dos dominios: el dominio globular de la región C-terminal y un dominio no estructurado de la región N-terminal. El dominio globular tiene el motivo *histone fold*, formado por unos 65 aminoácidos que se estructuran en una hélice alfa corta seguida de un giro/hoja B, una hélice alfa larga, otro giro/hoja B y una última hélice alfa corta (16, 17).

En el nucleosoma, los extremos N-terminal de las histonas se disponen hacia afuera y estas colas son susceptibles de diferentes modificaciones post-traduccionales incluyendo acetilación y ubiquitinación de residuos de lisina (K), fosforilación de residuos de serina (S) y treonina (T), metilación de residuos de arginina (A), entre otros. Estas modificaciones también ocurren en la región globular de las histonas pero estos estudios son escasos (17).

En histonas, la fosforilación (adición de un grupo  $PO_4$ ) es catalizada por cinasas específicas y la relación que este proceso guarda con la regulación de la expresión génica es poco comprendida. La fosforilación de la histona H3 en la serina 10 es una de las más estudiadas. Esta se lleva a cabo por la cinasa-B-Aurora y desempeña un papel importante en la activación transcripcional y en la condensación del cromosoma durante la mitosis (17).

La ubiquitinación de histonas implica la unión covalente de uno o más monómeros de ubiquitina, una proteína de 76 residuos de aminoácidos altamente conservada en eucariontes. Esta modificación se ha reportado principalmente en los residuos K119, K120 y K143 de las histonas H2A y H2B, pero también se ha encontrado en H3 y H1. En histonas esta modificación regularmente corresponde a la adición de solo un monómero de ubiquitina, proceso que permite modificar la función de la proteína y de hecho se ha reportado que varios genes transcripcionalmente activos tienen un alto contenido H2A con residuos de K119 con mono-ubiquitina. También se ha reportado la poli-ubiquitinación en H2A y H2B lo cual marca a las proteínas para ser degradadas vía el proteosoma 26S (17).

La metilación de histonas involucra la adición de uno a varios grupos metilo a partir de la S-adenosil metionina por enzimas metil-transferasas de histonas (HMT) como SUV39H1 y G9a. El proceso ocurre en átomos de nitrógeno de las cadenas laterales de residuos de lisina

y arginina. Usualmente, las argininas pueden ser mono (me1) o di-metiladas (me2) y adicionalmente, sólo los residuos de lisina pueden ser tri-metilados (me3). La metilación de histonas puede activar o reprimir genes dependiendo del sitio metilado y el número de grupos metilo que se añaden; así, genes transcripcionalmente activos tienen mayor proporción de H3K9me1 y H3K4me3, mientras que en genes que se encuentran reprimidos predomina la H3K9me3. La presencia de H3K9me3 constituye un sitio de unión para HP1, la proteína de heterocromatina-1 que a su vez permite el reclutamiento de metiltransferasas de DNA y deacetilasas de histonas (HDACs), cuya acción en conjunto conducen la represión de genes (18).

### **Acetilación de histonas.**

La acetilación de residuos de lisina en el extremo N-terminal de las histonas es la modificación post-traducciona l mas estudiada ya que está bien demostrado que existe una correlación entre la acetilación de histonas y aumento de transcripción, esto debido a que la acetilación neutraliza la carga positiva del aminoácido y por lo tanto su afinidad de unión al DNA cargado negativamente, afectando así a la estructura de la cromatina, haciéndola más relajada y facilitando la acción de la maquinaria de transcripción. (19).

Consiste en la adición de un grupo acetilo proveniente de la acetil-CoA a las lisinas en la región N-terminal de las histonas (H3, H4, H2B, H2A).La hiperacetilación de las histonas es considerada como una marca de regiones transcripcionalmente activas, también se sabe que participan en otros procesos celulares como reparación y replicación del DNA. La acetilación es catalizada por enzimas acetiltransferasas de histonas (HATs) las cuales presentan un dominio específico “AT” con la secuencia de aminoácidos Arg/Gln-X-X-Gly-

X-gly/Ala, que es reconocido por la acetil- CoA (20). La acetilación de la histona H3 en los residuos K9, K14, K18, K23, K36 y K56, así como la acetilación de los residuos K5, K8, K12 y K16 en la histona H4, son de las más estudiadas (14).

Existen dos clasificaciones de las HATs, la primera se basa en su origen y función celular: HATs de tipo A y de tipo B. Las HATs de tipo A son enzimas nucleares que catalizan la acetilación de histonas que ya están depositadas en la cromatina. Por otro lado, las de tipo B son citoplasmáticas y son las responsables de acetilar las histonas que son recién sintetizadas y que necesitan ser transportadas del citoplasma al núcleo donde son necesarias para replicar el DNA.

La clasificación más aceptada considera criterios estructurales, como la presencia o ausencia de cromó-dominios, bromo-dominios y dedos de zinc. En este contexto, las HATs se dividen en GNATs, MYSTs, P300/CBP, factores generales de transcripción y cofactores de receptores nucleares (19). La superfamilia GNAT está constituida por miembros relacionados con Gcn5 y se caracterizan por presentar cuatro regiones (A, B, C, D) con diferentes grados de conservación. El más importante es el "A", llamado AT y que lo comparte con las demás HATs. Gcn5, PCAF, Hat 1, Elp3 y Hpa2 son los miembros más importantes de esta familia. La superfamilia MYST recibe este nombre por los miembros que la componen: MOZ, Ybf2/Sas, Sas2 y Tip 60. También presentan el motivo A que es reconocido por las acetil-CoA, un dominio dedo de zinc llamado C2HC (C-X2-C-X13-H-X-C) y el motivo "E-R2" (Esa1-Rpd3). Esta familia posee un cromó-dominio o un dedo de zinc adicional conocido como dominio PHD (19-21).

P300/CBP son dos proteínas grandes de aproximadamente 300 KDa que contienen más de 2400 residuos. En su secuencia se han identificado cuatro dominios, entre ellos un bromodominio que también se encuentra en otras HATS, como Gcn5 y PCAF. Estas proteínas presentan especificidad en su actividad de acetiltransferasas. Así, *in vivo*, CBP muestra preferencia para acetilar H4 en la K12 mientras que p300 prefiere a la K8 (lisina número 8) mientras que *in vitro* p300/CBP acetila preferentemente K12 y K15 en la histona H2B, K14, K18 y K56 en H3 y K8 en H4 (22).

El factor general de transcripción TAF<sub>II</sub>250 es una sub-unidad de TFIID y constituye una HAT cuya actividad depende de su asociación con multi-complejos de proteínas. De entre todas las HATs que forman complejos, las similares a SAGA (SAGA, SLIK, PCAF, STAGA y TFTC) y miembros de GNAT contienen subunidades TAF (23).

### **Deacetilación de histonas.**

La deacetilación o remoción de los grupos acetilo en las histonas se lleva a cabo por enzimas denominadas deacetilasas de histonas (HDACs). Este proceso se asocia con la compactación de la cromatina y con pérdida o silenciamiento de la expresión génica. Las HDACs son enzimas dependientes de zinc. En general las HDACs se encuentran formando complejos de represión que se reclutan en los factores de transcripción a través de “factores puente” como el NCoR (nuclear receptor corepresor), CoREST (co-RE1-silencing transcription factor) y mSin3a (mammalian SIN3 homolog A) (23, 24).

En humanos se han identificado 18 enzimas HDAC y se han subdividido en dos grandes grupos, la familia de HDACs dependientes de NAD<sup>+</sup> ó familia SIR2, también conocidas como HDAC de clase III y la familia clásica de HDACs que incluye a las HDAC de clase I,

II y IV y que se han agrupado en base a la homología con las levaduras. La Clase I incluye a las HDAC 1, 2, 3, 8; son de 350-500 aminoácidos de largo y tienen homología en su sitio catalítico con la proteína RPD3 de levaduras. Estas enzimas se localizan en el núcleo y se encuentran en la mayoría de tipos celulares; además se sabe que modulan la proliferación celular. Las de Clase II incluyen a las HDAC 4, 5, 6,7, 9, 10, que son más grandes, con cerca de 1000 aminoácidos y guardan una gran homología con la HAD-1 de levaduras. Las HDACs de Clase II se encuentran en constante movimiento entre el núcleo y el citoplasma y están involucradas en diferenciación celular (21). La clase IV solo está formada por la HDAC 11 que se encontró sobre expresada en células de leucemia y es la más reciente HDAC en ser identificada (25).

Los inhibidores de HDACs son moléculas que actúan sobre HDACs de clase I y II porque se unen al zinc en el dominio catalítico en diferentes modalidades, afinidades y sitios. Se clasifican en base a su estructura en: ácidos de cadena corta, como el butirato de sodio y ácido valproico; ácidos hidroxámicos, como el inhibidor natural tricostatina A (TSA); ciclo-tetrapéptidos no epoxi cetonas; benzamidas y moléculas híbridas.

El tricostatina A (TSA), fue el primer inhibidor natural de HDACs en ser descubierto. Es un metabolito microbiano aislado de *Streptomyces hygroscopicus*. Debido a que actúa como un potente inhibidor de deacetilasas de histonas, causa una marcada acumulación de histonas acetiladas, además de que afecta a diferentes factores de transcripción y otras proteínas que regulan procesos como la apoptosis y arresto del ciclo celular, en particular, TSA induce la inhibición del ciclo celular en la fase G1 y G2. Experimentos *in vitro* con diferentes líneas celulares han demostrado que TSA es muy efectivo a concentraciones nano molares. Debido a que TSA es un potente y específico inhibidor de deacetilasas de

histonas, se ha convertido en una herramienta importante en el análisis del papel de la acetilación de histonas en la regulación de la cromatina, diferenciación y ciclo celular (26, 27, 28,29).

## **ANTECEDENTES**

### **Fibrosis pulmonar.**

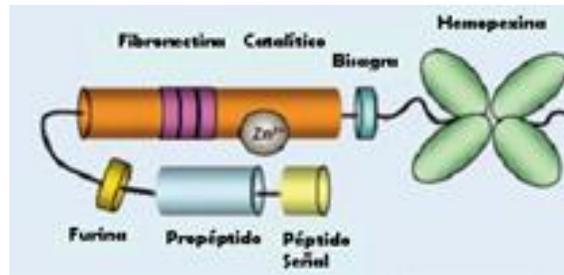
Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo heterogéneo de padecimientos que presentan manifestaciones clínicas, radiológicas y funcionales semejantes, en las que se compromete el intersticio pulmonar, afectando al epitelio, las paredes alveolares, el endotelio capilar, y el tejido conjuntivo. Según el consenso de American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society, se distinguen tres grupos dentro de las EPID. En el primer grupo se incluyen a las neumonías de causa desconocida, neumonías intersticiales idiopáticas. El segundo grupo incluye a las EPID de causa conocida o asociadas a entidades bien conocidas (por ejemplo enfermedades de la colágena) y un tercer grupo que incluye enfermedades granulomatosas y otros procesos que presentan una clínica e histología bien definida; como aquellas ocasionadas por fármacos y polvos orgánicos (30).

Dentro de las EPID, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la más agresiva y de peor pronóstico, con una tasa de mortalidad del 50% entre los 3 y 5 años después de haber sido diagnosticada, siendo una enfermedad más frecuente en varones mayores de 50 años edad. La FPI se caracteriza por la proliferación y formación de focos de fibroblastos en el parénquima del pulmón así como la acumulación anormal de moléculas de matriz extracelular, especialmente fibras de colágenas que destruyen la arquitectura pulmonar (31).

Los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de la FPI no se conocen en su totalidad y permanecen en constante estudio. Actualmente se considera que el acontecimiento principal en el desarrollo de la FPI es una agresión en el epitelio alveolar que desencadena una respuesta que conduce a la activación de los fibroblastos, favoreciendo su diferenciación a un fenotipo más agresivo llamado mio-fibroblasto e incrementando su capacidad de migración y proliferación que culmina con la formación de focos de fibroblastos adyacentes a los sitios de lesión en el epitelio. Estos eventos, junto con la constante producción exagerada de matriz extracelular llevan a la destrucción del parénquima pulmonar que limita la capacidad respiratoria y finalmente conducen a la muerte del individuo (31,32).

### **Colagenasa intersticial (MMP-1)**

La MMP-1 fue la primera MMP en ser identificada por Gross y Lapiere en el año de 1962. Es una molécula multifuncional que tiene un papel crítico en el proceso de remodelación de la MEC y su estructura sirve como prototipo para describir al resto de las colagenasas. Se encuentra expresada en una gran variedad de células, particularmente en fibroblastos, macrófagos, queratinocitos, condrocitos, células endoteliales y células epiteliales. Participa activamente en procesos fisiológicos como desarrollo embrionario, la ovulación y la reabsorción del útero después del parto. En el adulto su expresión se encuentra en niveles muy bajos pero su expresión aumenta considerablemente en algunas patologías como en el cáncer, la artritis reumatoide, osteoartritis, aterosclerosis, angiogénesis y periodontitis. En su estructura la MMP-1 cuenta con un propéptido que mantiene latente a la enzima, un dominio catalítico, y un dominio tipo hemopexina que le da especificidad por su sustrato (33-36).



Esquema de la estructura de la MMP-1

La forma más abundante de la MMP-1 no está glicosilada y tiene un peso molecular de aproximadamente 57KDa y en menor grado, también se puede encontrar en su forma glicosilada de 61-67 KDa, dependiendo del grado de glicosilación. La MMP-1 puede degradar a la colágena tipo I en fragmentos de  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{3}{4}$  a pH neutro, pero también puede digerir otro tipo de moléculas sustratos como el agregano, versicano, perlecan, caseína, nidógeno, serpinas y tenascina-C (33).

En el humano, el gen de la MMP-1 se localiza dentro de un grupo de varios genes de MMPs en el cromosoma 11q22.3, es de ~10Kb y tiene una estructura conformada por 10 exones y 11 intrones (33,34). La región del promotor de la MMP-1 contiene una caja TATA a -30 pb, un sitio de unión AP-1 (Activation Protein-1) aproximadamente a -70 pb (5'-TGAG/CTCA-3') en el que se unen factores de transcripción de las familias Fos y Jun, ya sea como homodímeros de Jun (c-Jun, Jun B o Jun C) o heterodímeros *fos-jun*, otro sitio AP-1 (5'-TTAATCA-3') se encuentra a -186pb. Adicionalmente, el promotor cuenta con otros elementos de regulación (Tabla 2) que incluyen sitios de unión a AP-2, Ets/PEA3, Sp1, NFkB y se ha reportado un polimorfismo la inserción de una guanina en la posición -1607 genera una secuencia 5'-GGA-3' que es reconocida por factores transcripcionales de la familia Ets (36, 37).

**Tabla 2.** Elementos de regulación en el promotor de la MMP-1 (34).

<b>Elemento consenso</b>	<b>Secuencia localización p. b.</b>	<b>Agente regulador</b>
AP-1	TGAGTCA/-72 TTAATCA/-181 TCAGTCA/-436 TGAGTAA/-562 TGAGTAA/-891 AGAGTCA/-1062	Positivo TPA IL-1 TNF
Dexametasona	TGACTTA/-1602 TGACTTA/-1955 TGAGTGA/-3471	Negativo Ácido retinoico
Pea3	AGGAT/-88 AGGAA/-1390 AG*GAT/-1608 AGGAT/-2101 AGGAA/-3108 AGGAA/-3837	Positivo TPA Negativo Ácido retinoico
TIE	GAATTGGAGA/-245	Negativo TGF-B
CCAAT (C/EBP-b)	CCAAT/-1985 CCAAT/-2326	Positivo Diferenciación de monocitos
Caja CACCC	CACCC/-385 CACCC/-1821 CACCC/-1937	
CREB	TGACG/-1540 TGACG/-3187	
Dorsal	ATGGAAAA/-2886	Positivo: IL-1
SP-1	GGCGG/-2208	
Motif OCTA	ATGCAAAT/-960	
AP-2	TGGGA/-960 TGGGGA/-2695	

La transcripción de MMP-1 se puede regular por la interacción con citosinas, hormonas y factores de crecimiento. Moléculas como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, PDGF, IL-1 son capaces de aumentar o disminuir la expresión de MMP-1 a través de diferentes vías de transducción

de señal como la regulación vía NFκ B ó vía MAPK cinasas. La activación de la vía ERK por EGF puede activar simultáneamente múltiples genes de MMP, incluyendo MMP-1. En un estudio se demostró que IL-1-β estimula la transcripción en condrocitos a través de la activación de ERK y el factor de transcripción C/EBP- β. El TGF-β, la vitamina A y los derivados de ácidos retinoicos suprimen la transcripción de MMP-1 (38-40).

Los polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP), también alteran la expresión de MMP-1 y en algunos casos, esta alteración se ha asociado con el desarrollo de enfermedades como por ejemplo, los sujetos con el genotipo 2G/2G y el alelo 2G del polimorfismo localizado en la posición -1607, tienen mayor riesgo de desarrollar FPI. Recientemente se encontró un nuevo SNP en la posición -755 (G/T) que crea un genotipo (G/G) que puede ser blanco para la unión de factores de transcripción de la familia AP-1, lo cual podría favorecer la expresión de MMP-1 y el desarrollo de FPI en pacientes fumadores (41).

## **JUSTIFICACION**

A nivel del intersticio pulmonar, la proliferación y formación de focos de fibroblastos, así como la acumulación desmedida de matriz extracelular principalmente fibras de colágena, son tres de los eventos más importantes que ocurren en la fibrosis pulmonar idiopática.

Se ha reportado que laMMP-1, principal enzima encargada de degradar las fibras de colágena, se encuentra altamente expresada en tejido de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (42), y también se ha encontrado aumentada en el suero de estos pacientes (43).Sin embargo, existen evidencias de que la sobre-expresión de esta enzima podría estar restringida a células delos epitelios alveolar y de los bronquiolos, pero en fibroblastos de las zonas fibróticas está prácticamente ausente, lo cual representa una paradoja en el sentido

de que son los fibroblastos los que deberían estar expresando la enzima para degradar la colágena depositada (44). Esto representa un problema ya que nos indica que existe una deficiencia en los fibroblastos que secretan esta enzima el cual tal vez se deba a un problema a nivel de regulación genética.

En los últimos años se han desarrollado trabajos que se centran en la regulación de la expresión génica vía mecanismos epigenéticos, como acetilación de histonas pero su estudio en la FPI es escaso. Así mismo, existen pocos estudios enfocados en la acetilación de histonas y la regulación epigenética en genes de MMP's, por lo cual estamos interesados en conocer si en fibroblastos de pulmón con FPI, la acetilación de histonas ésta involucrada en la regulación de la MMP-1.

## **OBJETIVO**

Investigar si la expresión de la MMP-1 en fibroblastos de pulmón se regula por acetilación de histonas.

### **Objetivos particulares:**

- Comparar la expresión de MMP-1 en fibroblastos normales y de FPI.
- Analizar si el utilizar un inhibidor de HDAC como el TSA modifica la expresión de MMP-1 en fibroblastos derivados de pulmón de pacientes con FPI.
- Evaluar el estado de acetilación de la histona H3 en el promotor de la MMP-1.
- Demostrar como afecta el estado de acetilación de la histona H3 en el promotor de la MMP-1 en la expresión del gen.

## **MÉTODOS**

### **Cultivo de fibroblastos.**

Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos pulmonares previamente establecidos en el laboratorio. Para este trabajo se analizaron una línea de fibroblastos de pacientes diagnosticados con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y una línea primaria de fibroblastos considerados como normales. Los fibroblastos se aislaron de biopsias de pulmón mediante un tratamiento enzimático con tripsina-EDTA y se establecieron en cajas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con medio nutriente Ham F-12 (Gibco, BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina 10, 000 U/ml, estreptomycin 10 mg/ml y anfotericina B 25 µg/ml, a una temperatura de 37°C y con una mezcla gaseosa de 5% de CO<sub>2</sub>/9% aire. Cuando los cultivos alcanzaron un 90% de confluencia, estos se subdividieron, se cultivaron en cajas de 75 cm<sup>2</sup> y se congelaron en varias alícuotas para su uso posterior.

### **Tratamiento de células.**

Cultivos de fibroblastos normales y FPI se crecieron en cajas P100 con medio F12. Cuando las células alcanzaron el 75% de confluencia, el medio se retiró y se dejaron durante 18 horas en medio sin suero. Posteriormente, a cada caja se le adicionaron 10 ml de medio nuevo sin suero conteniendo tricostatina A, a una concentración final de 300 nM y las células se dejaron por un periodo de 24h. Como controles se utilizaron los mismos fibroblastos a los cuales se les adiciono medio sin suero más DMSO al 0.001% que se utilizó como vehículo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado en dos experimentos independientes.

### **Obtención de medios condicionados y RNA.**

Después de estimular a los fibroblastos con o sin TSA por 24hrs, se recupero el medio que contiene los productos secretados por las células (medio condicionado). El medio de cada una de las cajas de cultivo se colocó en tubos de 15 ml, se centrifugaron a 2800g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos con inhibidores libres de EDTA y se guardaron a -70°C para su uso posterior.

Para la extracción de RNA, las células se lavaron con PBS frio y se cosecharon colocándolas en tubos de 1.5 ml que se centrifugaron 3 min a 2500 g para obtener el pellet. La extracción de RNA se realizó re suspendiendo el pellet de células con 1 ml del reactivo Trizol (Invitrogen). Después de agregar 200 µl de cloroformo las muestras se agitaron durante 20 segundos y posteriormente se centrifugaron a 12000g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante con la fase acuosa se transfirió a otro tubo de 1.5 ml y el RNA se precipitó adicionando 500 µl de alcohol isopropílico. Después de centrifugar durante 15 min a 7000g y a 4°C, se eliminó el isopropanol y el pellet de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 75 % y después se centrifugó por 5 min a 7000 g y a 4°C. Por último, la muestra en el tubo se dejó secar durante 10 min a T.A y se adicionaron 20 µl de agua libre de RNAsas. La concentración de RNA se determinó en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000).

### **Cuantificación de proteínas.**

Las muestras de los medios condicionados se liofilizaron y se concentraron a 10X. La concentración de proteína se determinó utilizando el principio del método de Bradford con el reactivo Protein Assay (BioRad) y con una curva estándar de albúmina de 0.05mg/ml a 0.5 mg/ml. El ensayo se realizó en placas de 96 pozos siguiendo el protocolo descrito por el

fabricante. La concentración de las muestras se obtuvo interpolando los datos en la curva ajustada por regresión lineal.

### **Síntesis de cDNA.**

Se realizó la síntesis de cDNA por transcripción reversa con la enzima M-MLV y Oligo-dT como cebadores. Para ello, 1 µg de cada uno de los RNA fue tratado con DNAsa y la reacción de transcripción reversa se llevó a cabo con un estuche comercial (Monster cDNA, Epicentre) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

### **Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR).**

Se determinó la expresión de MMP-1 por PCR en tiempo real utilizando un termociclador RotorGen (Quiagen). La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando sondas Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) en una mezcla de reacción de 20 µl conteniendo 1 pM de la sonda marcada con FAM y 50 ng de cDNA que se mezclaron con 12.5 µl de un mix (Maxima Probe qPCR Master Mix, Fermentas) que contiene todos los elementos necesarios para la amplificación, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos a 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 15 segundos. El análisis de los resultados se hizo mediante cuantificación relativa para lo cual en cada muestra se amplificó el gen del RNA ribosomal 18s. Los resultados se trataron por medio del método  $2^{-\Delta CT}$  comparando el CT de MMP-1 contra el gen de referencia. Los resultados se muestran como el promedio de 2 experimentos independientes por duplicado.

## **Western Blot.**

Las medios condicionados se descongelaron y mezclaron con amortiguador Laemmli (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 20% glicerol-azul de bromofenol 1%, 2B-mercaptoetanol 5%). Se cargaron 30 µg de proteína total de cada una de las muestras y fueron separadas en geles poliacrilamida-SDS al 10%, los geles se corrieron a un voltaje de 150V durante una hora. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK) que se equilibró con buffer de transferencia durante 10 minutos junto con el gel. Las proteínas se transfirieron a 15V por 25 minutos en una cámara para transferencia semi-seca. Los sitios inespecíficos de unión en la membrana, se bloquearon incubando la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con leche al 5% en buffer TBS-T (10mM Tris base pH 8.0, 150mM de NaCl y 0.05% Tween 20). El anticuerpo primario para MMP-1 (Abcam) se incubó 18 horas a 4°. Después de lavar con TBS-T se añadió el anticuerpo secundario específico (1:2000) conjugado con peroxidasa de rábano y se dejó incubando a temperatura ambiente por 1 hora. La marca se reveló con el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire) utilizando una placa fotográfica para rayos X (kodak).

## **Inmunoprecipitacion de cromatina (ChIP).**

Después de estimular a los fibroblastos con TSA como se describió anteriormente, las células se cosecharon con tripsina y se pasaron a tubos de 15 ml. Se centrifugó para eliminar la tripsina 5 minutos a 1500 rpm a 4°C. El pellet se lavó con 10 ml de solución salina de buffer de fosfatos (PBS) y nuevamente se centrifugó para eliminar el PBS. Para fijar las interacciones “Cross-linking” del DNA- proteína el pellet de células se re

suspendió en medio fresco con formaldehído al 1% y se incubó por 10 minutos en un agitador a 300 rpm. Para detener la reacción, se adicionó 1ml de glicina (1.25 M) se mezcló por agitación. Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 7 minutos a 4°C, se desechó el medio, el pellet se lavó con PBS frío y se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm a 4°C.

En esta células se realizó la inmunoprecipitación de cromatina para la histona H3 acetilada con un estuche comercial (EpiQuik™ Acetyl-Histone H3 ChIP, Epigentek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, para obtener la cromatina, el pellet se resuspendió en 100µl de buffer pre-Lisis, se transfirió a tubos ependorf de 1.5 ml y se dejó en hielo por 10 min. Después de centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos se eliminó el sobrenadante con cuidado y se agregaron 100 µl de buffer de lisis, se incubó por otros 10 minutos en hielo agitando las muestras cada 2 minutos. Lo siguiente fue fragmentar la cromatina por sonicación. Cada muestra se sónico 10 veces con pulsos de 10 segundos y en frío. Después se centrifugaron a 12500g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml. Una vez fragmentado el DNA se incubó con el anticuerpo anti histona H3 acetilada y se inmunoprecipitó incubando a temperatura ambiente por 60 minutos en agitación. Ya que se fijaron las interacciones DNA- proteína H3 acetilada se degradaron las proteínas inespecíficas con proteínasa K por 15 minutos a 65°C para obtener solo el DNA que interactuó con las proteínas H3 acetiladas (reversión del “cross-linking”) y ya que se obtuvo el DNA se purificó en columnas. Después de lavar las columnas con etanol al 70% y al 90 el DNA fue eludido en 20µl de buffer de elución (50mM tris-Cl, pH 7.5, 10 mM EDTA y 1% SDS) y se cuantificó por espectrofotometría en un Nanodop 1000.

## PCR para el promotor de la MMP-1

El DNA que fue inmunoprecipitado se analizó por PCR utilizando iniciadores (primers) para la región promotora de la MMP-1. Se diseñaron 6 pares de iniciadores (primers) para analizar el promotor de la MMP-1 que fue subdividido en 6 regiones como sigue:

**R1** 5'-GGCATGCAAATCACCAAAA-3' (sentido); 5'-ATCCTCCCCTTCAAGCTGT-3' (antisentido). **R2**: 5'-ACAGCTTGAAGGGGAGGATT-3' (sentido); 5'-TTCTTGGTTGCTTCATGCTG-3' (antisentido). **R3**: 5'-AAGCAACCAAGAAAACCACG-3' (sentido); 5'-CACTGAGGCCTGGGAAACA-3' (antisentido). **R4**: 5'-TGTTTCCCAGGCCTCAGTG-3' (sentido); 5'-TGGCTCTGTAATGAAAGATGTGTATTC-3' (antisentido). **R5**: 5'-CGGTCACCAGTACCCAAGACA-3' (sentido); 5'-TTGTTAAGCTGCCTGGTACCCT-3' (antisentido). **R6**: 5'-CCATGCCTGGCTCTGAGTAAA-3' (sentido); 5'-TGGCTAGATACATTTTGGGTGGA-3' (antisentido). Para la reacción de amplificación se usaron 60 ng de DNA, 20 mM de buffer de Tris-HCl pH8.3, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 uM de nucleótidos (dCTP, dATP, dGTP y dTTP), 1uM de iniciadores (primers) y 1.25 U de Taq polimerasa.

Las condiciones de amplificación para cada región, la ubicación dentro del promotor y el producto esperado se muestran en la Tabla 3. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1 % preteñidos con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó durante 1 hora a un voltaje de 80 V en buffer TBE (Tris-borato-EDTA) y se observaron bajo luz UV en un transiluminador. Para obtener la imagen, los geles se digitalizaron con una cámara digital Kodak DS120 utilizando el sistema de foto documentación Kodak Digital Science (Kodak).

Tabla 3.

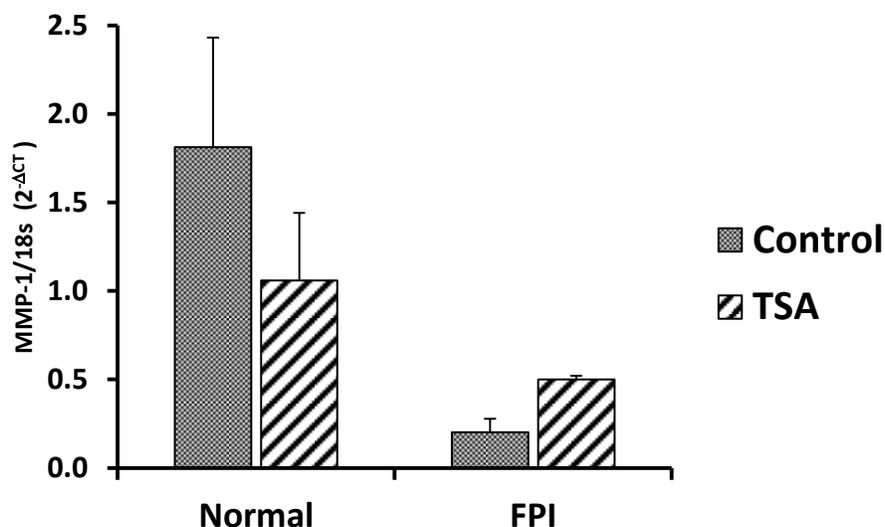
Región	Posición en el promotor	Condiciones de amplificación	Ciclos	Producto
R1	-3513 a -4149	95° 59° 72° 30s 30s 40s	35	636 pb
R2	-2892 a -3533	95° 62° 72° 30s 30s 30s	35	641 pb
R3	-1980 a -2905	95° 60° 60° 30s 30s 1m	35	925 pb
R4	-1300 a -1999	95° 64° 72° 30s 30s 1m	35	699 pb
R5	-571 a -1372	95° 62° 72° 30s 30s 30s	35	801 pb
R6	-1 a -644	95° 60° 72° 30s 30s 30s	35	900 pb

## RESULTADOS

### **Expresión génica de MMP-1 en fibroblastos de pulmón normal y de pulmón con FPI.**

Para evaluar si existen diferencias en la expresión basal de MMP-1 entre fibroblastos normales y fibroblastos de pacientes con FPI y determinar si la inhibición de deacetilación modifica este patrón, las células se sembraron y se mantuvieron durante 24 horas en medio sin suero en ausencia o presencia de TSA 300nM. La expresión de MMP-1 se cuantificó por PCR en tiempo real y se hizo un análisis relativo del gen de MMP-1 contra el gen 18s ribosomal.

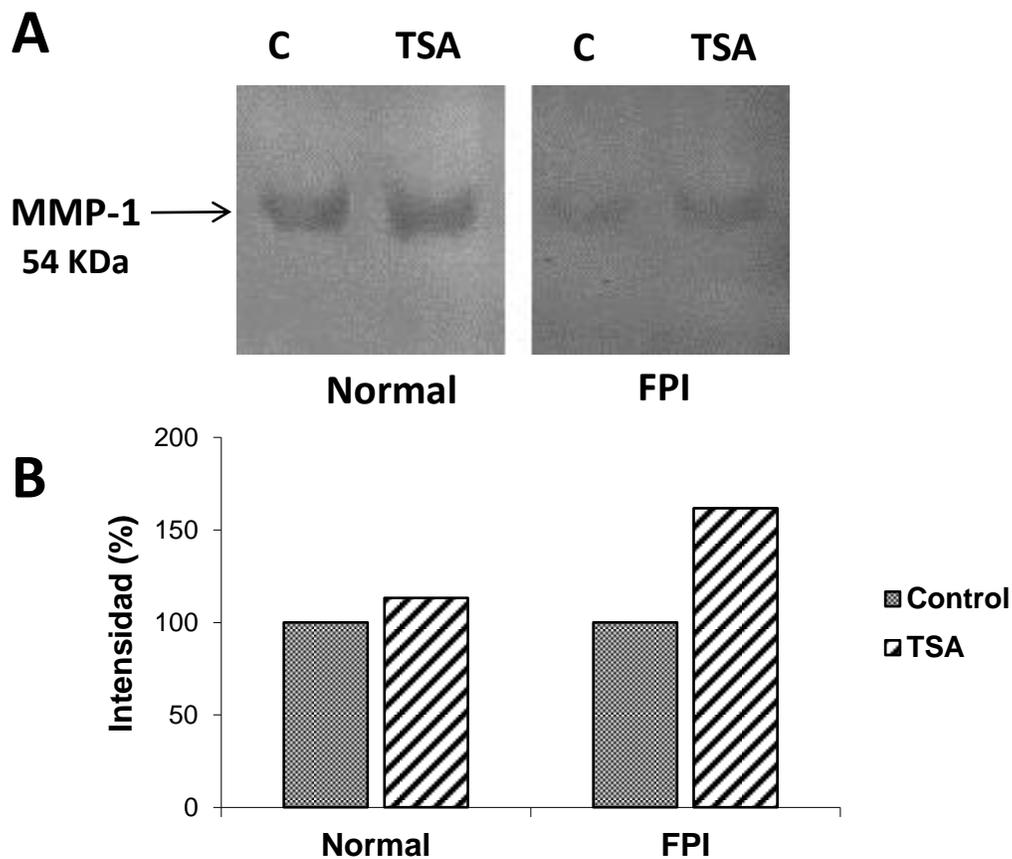
Como se observa en la Figura 1, en condiciones basales (Control) los fibroblastos de FPI expresan aproximadamente 9 veces menos el gen de MMP-1 en comparación con los normales ( $0.2 \pm 0.08$  en FPI vs  $1.81 \pm 0.62$  en Normales). Por otra parte, el estímulo con TSA modifica la expresión basal de MMP-1; en el caso de los fibroblastos normales, el TSA disminuyó la expresión en aproximadamente 1.7 veces, de 1.81 en Control a 1.06 con TSA y en fibroblastos de FPI el TSA incrementó 2.5 veces la expresión de MMP-1, de 0.2 en control a 0.5 con TSA.



**Figura 1.** Expresión de MMP-1 en fibroblastos de pulmón normales y fibróticos, sin estímulo y estimulados durante 24 horas con TSA (300 nM). Los valores se expresan en unidades arbitrarias del análisis de delta CT del gen de MMP-1 ajustado contra el 18s.

#### Niveles de MMP-1 en medios condicionados.

Para determinar si los resultados de expresión génica se ven reflejados a nivel de proteína, los niveles de MMP-1 en los medios condicionados de los fibroblastos cultivados en presencia o ausencia de TSA durante 24 h y se analizaron por inmunoblot. Los resultados muestran que los fibroblastos de FPI secretan menor cantidad de MMP-1 en comparación con los fibroblastos Normales (Figura 2A). Sin embargo, un análisis por densitometría considerando los valores basales (Control) como el 100%, muestra que el TSA incrementa la producción de MMP-1 en ambos, normales y fibróticos aunque en normales el incremento fue solo del 13.2% mientras que en los fibróticos fue de 61% (Figura 2B).



**Figura 2.** **A)** Inmunoblot de MMP-1 en medios condicionados de fibroblastos normales y fibróticos sin estímulo (C) y estimulados con TSA. **B)** Análisis por densitometría.

### Análisis del estado de acetilación del promotor de la MMP-1.

La acetilación y deacetilación de histonas son mecanismos que regulan la transcripción de genes, favoreciendo o dificultando la interacción de factores de transcripción con las secuencias promotoras de los genes en el DNA. Para investigar si estos mecanismos están implicados en la expresión de MMP-1, los fibroblastos normales y de FPI se cultivaron en ausencia o presencia de TSA durante 24 horas. Se utilizó un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con un anticuerpo contra la histona H3 acetilada para establecer si la proteína se une o está localizada junto a la secuencia del promotor de la MMP-1. Con esta

técnica se precipita el DNA que se asocia a la histona H3 acetilada en residuos de lisina (K9, K14, K18, K23, K36) y posteriormente mediante PCR se analizó si el promotor de la MMP-1 amplifica en estas muestras. La Figura 3 muestra los productos de amplificación obtenidos para cada una de las 6 regiones en las que se dividió el promotor de la MMP-1. En condiciones basales o Control (C), en los fibroblastos de FPI se logró amplificar las regiones R1, R2, R5 y R6 del promotor mientras que en los fibroblastos normales no se observó ningún producto. Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con TSA, se logró amplificar las regiones R2, R3, R4 y R5 de los fibroblastos de FPI y R5 y R6 en los normales. Estos resultados indican que es muy probable que en los fibroblastos de FPI, una buena porción del promotor de la MMP-1 (de R2-R5) que corresponden de -571 a -3533 pb se encuentren en estado deacetilado. No se observó amplificación de productos inespecíficos.

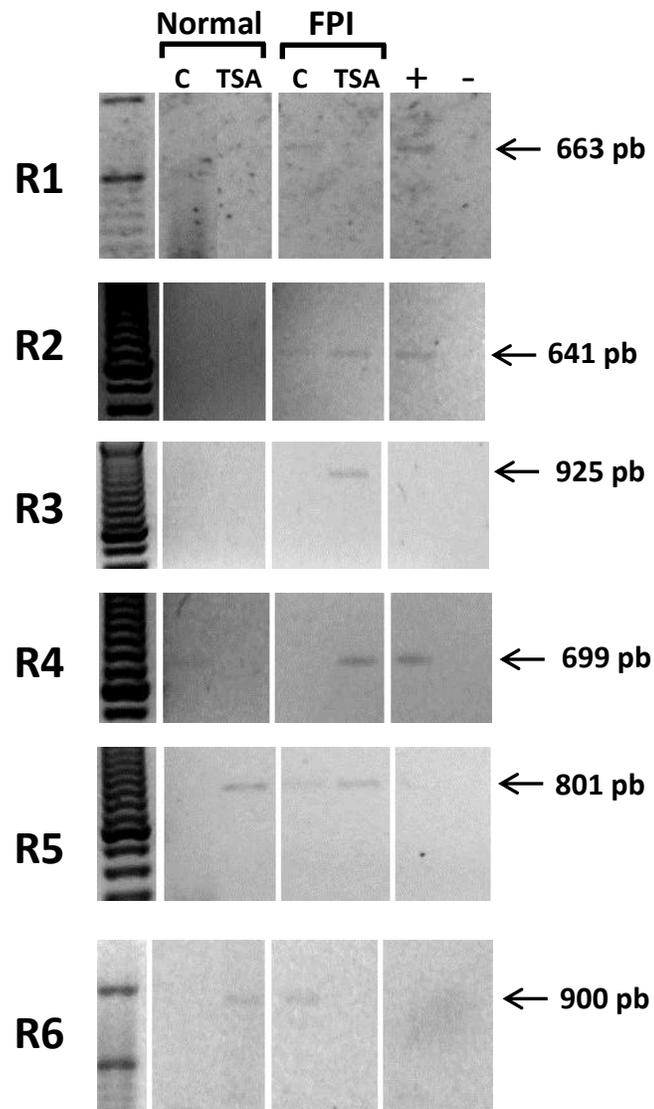


Figura 3. Geles de agarosa al 1% para los productos de amplificación del promotor de la MMP-1 en DNA de fibroblastos normales y de FPI en ausencia o presencia de TSA (300nM) que fue inmunoprecipitado por ChIP con un anticuerpo contra la histona H3 acetilada. El promotor fue dividido en 6 regiones (R1-R6).

## **DISCUSION Y CONCLUSION.**

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad crónica y letal. Los procesos celulares y moleculares que participan en la aparición y progresión de esta enfermedad, aún no se conocen con precisión y permanecen en constante estudio. En un esfuerzo por entender los mecanismos patogénicos de la enfermedad, Selman y col. (32) proponen que en la FPI el daño en el epitelio pulmonar podría desencadenar la proliferación, migración y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Estas células forman estructuras que se conocen como focos de fibroblastos, donde se producen cantidades exageradas de moléculas de la matriz extracelular que conducen a la destrucción del parénquima pulmonar y finalmente a la muerte del individuo.

En condiciones normales, existe un equilibrio entre la producción y la degradación de moléculas de matriz extracelular en el intersticio pulmonar. Los fibroblastos son las principales células responsables de la producción de colágena pero también de la enzima responsable de su degradación, la colagenasa intersticial ó MMP-1. Existen reportes que indican que la MMP-1 se encuentra sobre-expresada en pulmón de pacientes con FPI (42) pero esto resulta contradictorio en el sentido de que si está sobre expresada, entonces no debería existir la acumulación excesiva de colágena, característica que distingue a la FPI (44). Sin embargo, en este contexto existen estudios que han mostrado que los fibroblastos de los focos no expresan la MMP-1, lo cual nos hace pensar que existe un problema en la regulación de este gen que impide que la enzima se exprese y que se degrade la colágena. La acetilación de histonas es un proceso clave en la regulación transcripcional de varios genes, debido a que la modificación de las histonas puede alterar el arreglo de la cromatina, llevándola de un estado denso o compacto a un estado más laxo y accesible, facilitando la

unión de la maquinaria transcripcional y favoreciendo la expresión del o de los genes presentes en esos sitios (18). Sin embargo, existen pocos trabajos enfocados a establecer qué papel desempeña la regulación epigenética en la expresión de MMP's y en particular de la MMP-1. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue investigar si la acetilación de histonas participa en la regulación transcripcional de la MMP-1 en fibroblastos de pacientes con FPI.

En primer lugar, al analizar los niveles de expresión de MMP-1 por PCR en tiempo real fue evidente que los fibroblastos de FPI expresan menos MMP-1. Los resultados muestran que tienen nueve veces menos expresión de MMP-1 comparado con los fibroblastos normales.(Figura 1). Cuando las células se estimulan con TSA se inhibe la actividad de HDACs lo cual aumenta la acetilación y se favorece un estado en donde la cromatina se encuentra más accesible a la transcripción. En el caso de los fibroblastos de FPI, el estímulo con TSA provocó un incremento del 150% en la expresión de MMP-1. Este mismo comportamiento también se observó cuando se analizó la presencia de la proteína en los medios condicionados de las células (Figura 2) de modo que estos dos resultados sugieren que probablemente en los fibroblastos fibróticos la expresión de MMP-1 está disminuida porque se encuentran en un ambiente de histonas en estado deacetilado.

El TSA es un inhibidor inespecífico de HDACs y en teoría, este inhibidor propicia la acetilación de histonas, lo cual debería favorecer la expresión de MMP-1, tal y como se observó en los fibroblastos de FPI. Sin embargo este fenómeno no se repite en los fibroblastos normales en donde los resultados muestran que el TSA disminuyó la expresión del mRNA de MMP-1 y la producción de proteína permanece prácticamente igual. (Figura 1)El uso de solo una línea de fibroblastos normales y una de FPI dificulta la explicación de

esta diferencia y para dar una conclusión más racional de este fenómeno se necesitaría aumentar el número de muestras. Sin embargo, con todo y las reservas respecto al número de muestras, una posible explicación de esta diferencia podría estar en el hecho de que existen evidencias que indican que los efectos de TSA pueden ser diferentes dependiendo del tipo celular. En un estudio realizado por Young y colaboradores (45) se encontró que en condrocitos de la línea SW153, la expresión de MMP-1 disminuye cuando estas células son tratadas con TSA. Martens y colaboradores (46) encontraron resultados similares, ellos utilizaron células humanas de glioblastoma y observaron que el TSA aumenta la acetilación de la histona H3 pero que este suceso no es suficiente para observar un incremento en el gen de MMP-1 por lo que sugieren que la acetilación no es el único suceso implicado en la transcripción de MMP-1, sino que también están implicados otros procesos como metilación y fosforilación de histonas y adicionalmente se ha sugerido que el TSA puede interferir con factores de transcripción específicos, como c-jun el cual se sabe está implicado en la expresión de MMP-1 (47).

Por el contrario, los hallazgos reportados por Kim y colaboradores (48) muestran un comportamiento similar a lo que nosotros encontramos en los fibroblastos de FPI. Estos autores mostraron que en fibroblastos dérmicos humanos, la expresión de MMP-1 se incrementa cuando las células son estimuladas con los inhibidores de acetilación TSA y butilato de sodio en una manera dosis dependiente, esto debido en parte a que se incrementa la acetilación de la histona H3 además de que la actividad total de HDAC fue disminuyendo, mientras que la actividad de las HAT fue incrementada. Entonces es probable que en nuestro trabajo, el efecto diferencial en la expresión de MMP-1 en fibroblastos normales y de FPI posiblemente se deba a la naturaleza misma de la

enfermedad aunque esto solo es una especulación y como ya se mencionó, se deben analizar más muestras para verificar este resultado.

La MMP-1 no es el único ejemplo de proteínas que son importantes para el desarrollo de la FPI y que son reguladas porque el gen se encuentra en un estado de deacetilación. Un ejemplo es el de IP-10 ó CXXL10, una molécula que desempeña un papel importante en la FPI como inhibidor de angiogénesis. Un estudio reciente muestra que esta proteína se encuentra disminuida en fibroblastos de pacientes con FPI y que la represión de esta proteína es debida a que los fibroblastos mantienen un estado donde la deacetilación se encuentra incrementada (49).

Los resultados obtenidos en el análisis de ChIP refuerzan la idea de que en condiciones basales la expresión de MMP-1 en los fibroblastos de pacientes con FPI es apagada o reprimida porque en la región del promotor las histonas se encuentran en un estado deacetilado y mantienen la cromatina compacta. Nuestros resultados muestran que una buena proporción del promotor de MMP-1 amplifica cuando en los fibroblastos se favorece la acetilación de histonas con TSA. En el promotor de MMP-1, los productos de amplificación que se lograron observar corresponden a la secuencia que va de -571 a -3533, que representa aproximadamente el 75% de la longitud total del promotor y en la cual se encuentran la mayoría de los sitios de regulación de la MMP-1 (ver Tabla 2). La regulación de la expresión de la MMP-1 debido a factores que favorecen la acetilación ya ha sido demostrada y en particular se ha descrito que en este proceso, el ensamble y la participación de diferentes complejos como p300 y componentes de SWI/SNF tienen un papel importante (46, 48).

En conclusión, y con las reservas debidas al estudio de solamente una línea celular, los resultados de este trabajo sugieren que en los fibroblastos de pacientes con FPI, la disminución de MMP-1 puede deberse en parte a que en esa región predomina un estado donde las histonas se encuentran deacetiladas y por la tanto mantienen la región del promotor de la MMP-1 inaccesible.

## REFERENCIAS.

1. Pardo A, Selman M. (1996). Matrix metalloproteinases and lung injury. *Braz J Med Biol Res* 29:1109-1115.
2. Chinoy R. (2003). Lung growth and development. *Frontiers in Bioscience*. 8:329-415.
3. Ramos C, Becerril C, Cisneros-Lira J, Montaña M. (2004). El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 17: 215-231.
4. Ramos C, Montaña M, García-Álvarez J, Ruiz V, Uhal BD, 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 Moll Biol* 24:591-598.
5. Visse R, Nagase H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, function, and Biochemistry. *Circ Res*. 92:827-839.
6. Page-McCaw A, Ewald A and Werb Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *NatRevMolCell Biol* 8:221-33
7. Somerville R, Oblander S, Apte S. (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks *Gen Bio* 4:216. 1-216.11.
8. Brinckerhoff C. y Matrisian L (2002). Matrix Metalloproteinases: a tail of a frog that become a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:207-14
9. Selman M, Pardo A. (2004). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Pulmonary Fibrosis. En: *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. Lynch J P. Ed. Marcel Dekker, U.S.A. P 416-442.
10. Fanjul-Fernández, M., Folgueras A, Cabrera S, López-Otin C. (2010). Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 1803: 3-19.

11. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T. (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253:269-85
12. Cascales M, Álvarez-Gómez J. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm.*; 76:59-84.
13. Wolffe P, Gushin D (2000). Chromatin Structure Features and Targets that regulate Transcription. *J Struc Biol.* 129:102-122
14. Felsenfeld G. & Groudine M. (2003). Controlling the double helix. *Nature.* 421: 448-453
15. Grunstein Michael. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 389: 349-352.
16. Luger K. & Richmond T. (1998). The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet & Dev* 8:140-146.
17. Strahl B. & Allis D. C. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403: 41-45
18. Berger L Shelley (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet & Dev.* 12: 142-148
19. Kuo M and Allis C. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays.* 20:615-626.
20. Fukuda H, Sano N, Mutuo S and Horikoshi M. (2006). Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Brief funct genomic proteomic* 5: 190-208.
21. Gallinari P, Marco D, Jones P., Pallaoro M, Steinkuhler. (2007). HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res* 17: 195-211.
22. Verdone L, Agricola E, Caserta M and Mauro D. (2006). Histone acetylation: in gene regulation. *Brief funct genomic proteomic.* 5: 209-221.
23. Barnes P, Adcock I and Ito K. (2005). Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J.* 25: 552-563.
24. Eberharter A and Becker B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO reports* 3: 224-229
25. Xu W. Parmigiani R, Marks P. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 13:5541-52

26. Santini V. and Ferrari G. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular and Biological Activity as a Premise to Clinical Application. *Curr Drug Metab*, 8:383-394.
27. Yoshida M, Kijima M, Akita M and Beppu T. (1990). Potent and specific inhibition of Mammalian Histone Deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by Trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265:17174-17179.
28. Yoshida M, Horinouchi S and Beppu T. (1995). Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. 17:423-430
29. Recillas T y Escamilla A. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. Mensaje bioquímico, Vol XXVII. Depto Bioquímica, Fac Medicina.
30. Ancochea J, Antón E., Casanova A. (2004). Nuevas estrategias terapéuticas en la fibrosis pulmonar idiopática. *Arch Bronconeumol* 40 (supl 6): 16-22.
31. Pardo A, Selman M, (2002). Molecular mechanism of pulmonary fibrosis. *Front Biosci* 7: 1743-1761.
32. Selman M, King T y Pardo A. (2001) Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about its Pathogenesis and Implications for therapy. *Ann Intern Med.* 134:136-151
33. Pardo A. Selman M. (2005). MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 283-288.
34. Rutter J, Brinckerhoff C. (1999). Transcriptional Regulation of the Collagenase-1 (Matrix Metalloproteinase-1; MMP-1) gene. In: Collagenases. W. Hoeffler ed, R.G. Landes Company pp.55-71.
35. Arakaki P A., Marques M R, Santos M. C. (2009). MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *J. Biosci.* 34:313-320.
36. Vincenti M, Brinckerhoff C. (2007). Signal transduction and Cell-type Specific Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression: Can MMPs be Good for you? *J. Cell. Physiol.* 213:355-364.
37. Benbow U, Brinckerhoff C. (1997). The AP-1 Site and MMP Gene Regulation: What is All the Fuss About? *Matrix Biology* 15: 519-526.
38. Winkler M., Fowlkes J. (2002). Metalloproteinase and growth factor interactions: do they play a role in pulmonary fibrosis? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283: L1-L11.

39. Vincenti M, Brinckerhoff C. (2002). Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res* 4: 157-164.
40. Mauviel A. (1993). Cytokine Regulation of Metalloproteinase Gene Expression. *J Cell Biochem* 53:288-295.
41. Checa M, Ruiz V, Montaña M, Velázquez R, Selman M, Pardo A. (2008). MMP-1 polymorphisms and the risk of idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet* 124:465-472.
42. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Kaminski N, Zlotnik A. (2006). Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 173: 188-98
43. Rosas I, Richards T, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin A, Lindell K, Cisneros J, MacDonald S, Pardo A, Sciruba F, Dauber J, Selman M, Gochuico BR, Kaminski N (2008). MMP-1 and MMP-7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Medicine*. 5(4):e93.
44. Pardo A, Selman M (2006) Matrix metalloproteases in the aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc*. 3:383-388
45. Young D, Lakey R, Pennington C, Jones D, Kevorkian L, Edwards D, Cawston T, Clark IM. (2005). Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res Ther*. 7: 503-512.
46. Martens J, Verlaan M, Kalkhoven E and Zentena A. (2003). Cascade of Distinct Histone Modifications during Collagenase Gene Activation. *Mol Cell Biol*. 23: 1808-1816.
47. Clark I, Swingler T, Young D. (2007) Acetylation in the regulation of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression. *Front Bios*. 12:528-535.
48. Kim M, Shin J, Eun H, Chung J. (2009) The role of p300 histone acetyltransferase in UV-induced histone modifications and MMP-1 gene transcription. *Plos One*. 4: e4864.
49. Coward W, Watts K, Feghali-Botswick C, Jenkins G and Pang L. (2010) Repression of IP-10 by Interactions between Histone Deacetylation and Hypermethylation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Mol Cell Biol* 12: 2874-2886.