

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE EPILISINA EN TEJIDO  
PULMONAR NORMAL Y DE PACIENTES CON NEUMONITIS  
POR HIPERSENSIBILIDAD**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLÓGA**

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

**SEMIRAMIS STEPHANIA GARCÍA TREJO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**M. en C. MARÍA DE LOS REMEDIOS JOSEFINA RAMÍREZ  
RANGEL**

**2012**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo proporcionado por el grupo de investigación de la Doctora Annie Pardo Cemo y el Doctor Moisés Eduardo Selman Lama, conformado por el laboratorio de bioquímica en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México y por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias: Ismael Cosío Villegas.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos de la alumna

García

Trejo

Semiramis Stephania

58 97 79 97

Universidad Nacional Autónoma de México

Biología

305010502

### 2. Datos del tutor

M. en C.

Ramírez

Rangel

María de los Remedios Josefina

### 3. Datos del Sinodal 1

Dr.

Selman

Lama

Moisés Eduardo

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.

Segura

Valdez

María de Lourdes

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Vilchis

Peluyera

Alfonso José

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.

Pablo

Velázquez

Angélica María

### 7. Datos del trabajo escrito

Comparación de la expresión de epilisina en tejido pulmonar normal y de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad

54 p

2012

La libertad es el oxígeno sin el cual la ciencia no podría respirar

*David Sarnoff*

La casualidad favorece a las mentes preparadas

*Louis Pasteur*

No te dejes atrapar por el dogma, el cual se encuentra vivo con el resultado de la ideología de otras personas. No permitas que el ruido de otras opiniones ahoguen tu interior y, ten el coraje para seguir la intuición.

*Steve Jobs*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la vida misma que me ha enseñado que lo que realmente importa en ella, con esfuerzo, constancia y dedicación se obtiene, a mis padres, Ana María Trejo Sánchez y Javier García Viguera, que sin ellos no podría disfrutar de la misma, y que me han dado lo mejor de ellos: enseñanzas, cuidados, reflexiones y comprensión, todo esto, traducido en amor y cariño.

A mis hermanos Marissa, Gabriel y Marco de los cuales he aprendido muchas cosas entre ellas el ver la vida desde diversas perspectivas, y que sin ellos no sería la persona que soy, ya que mi personalidad lleva una parte de su esencia dentro de mí.

A la Doctora Annie Pardo Cemo y al Doctor Moisés Eduardo Selman Lama, por haber confiado en este proyecto, por sus enseñanzas en clase a lo largo de mi formación como bióloga y por sus observaciones y aportaciones en cada seminario.

Al grupo de investigación de bases moleculares del metabolismo de la matriz extracelular y alteraciones asociadas a la patología pulmonar: A la Maestra Reme, quien me enseñó que la vida en laboratorio es más amena compartiendo, y que los experimentos salen bien si se hacen con calma, disposición y orden. Al Doctor Jorge, por su paciencia y sus valiosos consejos, de quien aprendí que un gran investigador puede tener mucho conocimiento y no elevarse hasta las nubes, y que lo más importante en un experimento es tener la seguridad de que todo saldrá bien.

A David quien me enseñó que una parte importante de la vida es la perseverancia, pero sobre todo el escuchar la opinión de las demás personas, aunque se termine haciendo lo contrario. A Jazmín quien me ha demostrado que a pesar de todos los contratiempos que tiene la vida con amor y dedicación se logra lo que se quiere. A Mariel quien formó parte del equipo epilisina y me hizo ver que la ciencia no es un lenguaje sobrehumano y que todos podemos llegar a entenderlo sin ningún problema.

A Ricardo, Luis, Adrián, Gustavo, Sandra y Paul, por sus enseñanzas prodigadas.

A los doctores Víctor, José Cisneros, Carlos Ramos, Marco Checa y Joaquín Zúñiga, quienes se encargaron en algún momento de mi formación como investigadora.

A la Doctora Carolina, al Maestro Alfonso Vilchis, la Doctora Angélica María Pablo Velázquez y la Doctora Lourdes Segura, quienes tuvieron la paciencia de revisar mi tesis.

A todos aquellos profesores que me hicieron ver lo maravilloso de la vida en este camino recorrido durante la licenciatura.

A mis sobrinas Marilú e Ixchel que son una parte muy importante en mi vida y que las quiero como si fueran mis hijas. A Humberto: quien ha sabido valorar las cosas importantes de la vida.

A mis tías: Rosa, Elena, Amparo y Alejandra quienes son el reflejo de mi pasado y me han demostrado que hay que esforzarse por lo que se anhela. A mis tíos: Francisco y Salvador. A mi abuelita: Aurelia.

A mis queridos alumnitos: Yissel, Mariel, Luis y Dani, de quienes he aprendido tanto y me demuestran que la vida es muy bella y más aún si se observa con detenimiento y curiosidad.

Al Doctor José Mariel Pérez Ramírez, quien me motivó a no tener límites de ninguna índole ni prejuicios.

A la Doctora Susana Álvarez quien confía en mí. A la señora Pilar quien comprende que a veces el tiempo te hace malas jugadas.

A la razón por la que no me volví loca en la facultad y me hicieron mucho más agradable este recorrido por los conocimientos de la biología, mis amigos: Tere, Frida, Laurita, Luis, Daniel y Alan, a quienes estimo tanto.

Finalmente, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México quien me ha dado mucho más que educación, dándome la oportunidad de desempeñarme como un ser pleno en todos los aspectos.

# Índice

Abreviaturas.	5
I. Resumen.	8
II. Introducción.	10
II.I. Matriz extracelular.	10
II.II. Metaloproteinasas de matriz extracelular.	10
II.II.I. Metaloproteinasas arquetípicas.	12
II.II.II. Matrilisinas.	13
II.II.III. Gelatinasas.	13
II.II.IV. Metaloproteinasas activadas por furina.	13
II.II.IV.I. Epilisina o MMP-28.	14
II.II.IV.I.I. Expresión de epilisina.	15
II.II.IV.I.II. Ratón deficiente de epilisina.	17
II.III. Aparato Respiratorio.	17
II.IV. Neumonitis por Hipersensibilidad.	18
III. Objetivos.	21
IV. Material y método.	22
IV.I. Obtención de muestras y población de estudio.	22
IV.II. PCR en tiempo real qPCR.	22
IV.II.I. Extracción de ARN.	22
IV.II.II. Síntesis de cDNA's.	23
IV.II.III. Purificación de los productos de PCR para epilisina y 18s.	25
IV.II.IV. Curva patrón.	27
IV.III. Inmunohistoquímica.	29
IV.IV. Cultivo celular, extracción nuclear y citoplasmática.	30
IV.V. Extracción de proteínas totales.	31
IV.VI. Cuantificación de proteína.	31
IV.VII. Western Blot.	32
V. Resultados.	34
V.I. PCR en tiempo real.	34
V.II. Inmunohistoquímica.	35
V.III. Western Blot.	38
VI. Discusión.	40
VII. Conclusiones.	44
VIII. Perspectivas.	45
IX. Apéndice.	46
X. Referencias.	52



## Abreviaturas

<b>AAE</b>	Alveolitis alérgica extrínseca.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AEC</b>	<i>3-Amino-9-ethylcarbazole</i> . Aminoetilcarbazol.
<b>Agua dde</b>	Agua destilada desionizada y esterilizada.
<b>APMA</b>	p -Aminoetilmercurio.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ARN<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>BMDM</b>	<i>Bone Marrow Derived Macropaghes</i> . Macrófagos Derivados de Médula Ósea.
<b>CTGF</b>	<i>Connective Tissue Growth Factor</i> . Factor de crecimiento de tejido conectivo.
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato.
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido.
<b>dNTP's</b>	Dinucleótidos trifosfatados.
<b>DTT</b>	Ditiotreitol.
<b>EDTA</b>	Etilendiaminotetraacético.
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> . Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
<b>GPI</b>	Glucosilfosfatidilinositol.
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i> . Peroxidasa de rábano.
<b>HaCat</b>	<i>Human Keratynocyte Cell Line</i> . Línea celular humana inmortalizada de queratinocitos.
<b>HeLa</b>	Células Henrietta Lacks.

<b>Kb</b>	Kilobases.
<b>KC</b>	<i>Keratinocyte chemoattractant o keratinocyte derived chemokine</i> . Quimiocina derivada de queratinocitos.
<b>Kd</b>	Constante de disociación.
<b>kDa</b>	Kilodaltons.
<b>M</b>	Molaridad (moles/litro)
<b>MDCK</b>	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i> . Riñón Canino Madin-Darby.
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i> . Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
<b>MIP-2</b>	<i>Macrophage inflammatory protein</i> . Proteína inflamatoria de macrófagos.
<b>MMP's</b>	<i>Matrix Metalloproteinases</i> . Metaloproteinasas de matriz.
<b>MT-MMP</b>	<i>Membrane type MMP</i> . Metaloproteinasas transmembranales.
<b>NH</b>	Neumonitis por Hipersensibilidad.
<b>NuMAP's</b>	<i>Nuclear MMP's associated proteins</i> . Proteínas asociadas a MMP's nucleares.
<b>PARP</b>	<i>Poly-ADP-ribose-polymerase-1</i> . Poli-ADP-ribosa-polimerasa 1.
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> . Buffer de fosfatos salino.
<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PVDF</b>	<i>Polivinilfluoride</i> . Polivinilfluoruro.
<b>qPCR</b>	PCR en tiempo real.
<b>RECK</b>	<i>Reversion cysteine-rich protein with kazal motifs</i> . Reversion de la protein rica en cisteínas con motivos Kazal.
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto.

<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> . Dodecilsulfato de sodio.
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> . Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato.
<b>SIBLINGS</b>	<i>Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins</i> . Pequeños ligandos de unión a integrinas N-asociadas a glicoproteínas.
<b>TBS-T</b>	<i>Tris- buffered saline tween-20</i> . Buffer tris salino con tween-20
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor beta</i> . Factor de crecimiento transformante
<b>TRENDIC.</b>	<i>Transcription enhancer dominant in chondrocytes</i> . Enhancer transcripcional dominante en condrocitos
<b>TIMP's</b>	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i> . Inhibidores tisulares de metaloproteinasas.
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> . Factor de necrosis tumoral alfa.

## I. Resumen

La matriz extracelular es una gran red de polisacáridos y proteínas que son secretadas por células especializadas llamadas fibroblastos, una vez fuera de la célula éstas moléculas forman grandes agregados cohesivos que permiten el soporte celular, controlan la distribución espacial de moléculas unidas a sí mismas facilitando la intercomunicación entre receptores de factores de crecimiento y receptores de matriz extracelular, censa y transduce señales definiendo las propiedades mecánicas permisivas instructivas para la diferenciación celular activando la señalización intracelular a través de la interacción con receptores de superficie celular, así como también está comprometida en la maquinaria del citoesqueleto. Mantiene su regulación espacio-temporal de liberación de moléculas embebidas como citocinas y factores de crecimiento con ayuda de enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas de matriz <sup>2</sup>.

Las metaloproteasas de matriz (MMP's) son una familia de enzimas endoproteinasas zinc-dependientes, por lo menos se han identificado 25 MMP's en vertebrados, de los cuales 24 genes están presentes en humanos.

Las actividades proteolíticas de las MMP's mantienen la homeostasis celular, procesando, activando o desactivando una gran variedad de factores solubles y regulando la actividad de mediadores de las vías inflamatorias <sup>6,7</sup>.

La metaloproteinasa de matriz 28 o también conocida como epilisina es el miembro más reciente de las MMP's y aparentemente el último miembro de la familia de las MMP's en mamíferos <sup>10</sup> la cual pertenece a las metaloproteinasas secretadas activadas por furina <sup>11</sup>.

Su patrón de expresión se distingue de otros miembros de la familia de metaloproteinasas, ya que muchas MMP's son expresadas únicamente bajo condiciones excepcionales así como aquellos relativos a daño, inflamación o enfermedad, en cambio el patrón de expresión de epilisina implica su homeostasis en tejido normal ya que también se expresa de manera basal en condiciones normales <sup>7</sup> así como también es expresada durante procesos patológicos como en diferentes carcinomas <sup>12</sup>.

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) ó Alveolitis Alérgica Extrínseca (AAE) es un síndrome multifactorial complejo con historia y presentación clínica variable la cual es ocasionada por la exposición prolongada a partículas orgánicas conocidas <sup>19</sup>, afectando de manera primaria a los alveolos (de ahí el sinónimo alveolitis alérgica) <sup>20</sup>.

Se sabe que las enfermedades pulmonares intersticiales son desencadenadas por un daño inicial que provoca un proceso inflamatorio el cual si no se resuelve hay proliferación y activación de fibroblastos y por lo tanto acumulación de matriz extracelular <sup>30</sup>, la cual es regulada a su vez por la acción de las metaloproteinasas.

Debido a que se sabe muy poco de la presencia, los efectos y el modo de acción de MMP-28 en pulmón, resulta interesante analizarla en NH, ya que se ha reportado sobreexpresada en otras enfermedades pulmonares como lo es la Fibrosis Pulmonar Idiopática, de acuerdo a análisis de microarreglos <sup>3</sup>. Los objetivos de este proyecto son: determinar el nivel de expresión de epilisina en tejido pulmonar de pacientes con NH y control normal mediante qPCR así como también determinar su ubicación tisular en tejido pulmonar con NH y control normal mediante análisis inmunohistoquímico.

De acuerdo a los experimentos hechos en este proyecto concluimos que: el análisis de expresión de epilisina mediante la técnica de qPCR no mostró diferencias significativas entre tejido normal de pulmón y de tejido pulmonar proveniente de pacientes con NH. El análisis de inmunohistoquímica reflejó una tinción positiva para epilisina en tejidos con NH, en núcleos de epitelio alveolar, epitelial y endotelial, así como también se demostró una tinción negativa para epilisina en tejidos normales de pulmón. Sin embargo de acuerdo al análisis de Western Blot para corroborar lo encontrado en inmunohistoquímica se detectó la presencia de epilisina de manera inactiva en el núcleo de células A549 de adenocarcinoma de pulmón de neumocitos tipo II.

## **II. Introducción**

### **II.I. Matriz Extracelular**

La matriz extracelular es una gran red de polisacáridos (como proteoglicanos) y proteínas como colágenas, fibronectinas, tenacinas, fibras elásticas y laminina, que son secretadas por células especializadas llamadas fibroblastos en el caso de tejido conjuntivo (como en células pulmonares) y osteoblastos en el caso del tejido óseo, las cuales se encuentran fuera de las células entre el límite endotelial y epitelial en los animales multicelulares, una vez fuera de la célula éstas moléculas forman grandes agregados cohesivos que permiten el soporte celular<sup>1</sup>.

Además de ser estructural, mantiene la integridad de los órganos, define la barrera entre los tejidos y proporciona elasticidad a los órganos en desarrollo, dirige la motilidad celular a partir de diversos gradientes, ya sean morfógenos (llamada quimiotaxis), proteínas adhesivas (llamada haptotaxis), o aquellas proteínas relacionadas en proporcionar dureza (durotaxis).

Controla la distribución espacial de moléculas unidas a sí mismas facilitando la intercomunicación entre receptores de factores de crecimiento y receptores de matriz extracelular. Censa y transduce señales definiendo las propiedades mecánicas permisivas instructivas para la diferenciación celular, activando la señalización intracelular a través de la interacción con receptores de superficie celular, así como también está comprometida en la maquinaria del citoesqueleto. Mantiene su regulación espacio-temporal de liberación de moléculas embebidas como citocinas y factores de crecimiento, con ayuda de enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas de matriz<sup>2</sup>.

### **II.II. Metaloproteinasas de matriz**

Las metaloproteinasas de matriz, metaloproteasas o matrixinas (MMP's) pertenecen al grupo de proteasas denominadas metzincinas, superfamilia de las metaloproteinasas, son una familia de enzimas endoproteinasas zinc-dependientes, ya que usan un catión divalente, usualmente zinc para activar una molécula de agua que es usada como nucleófilo para hidrolizar el enlace peptídico del sustrato<sup>3</sup>, son denominadas metzincinas ya que poseen un residuo conservado de metionina en el sitio activo el cual forma una asa entre el prodominio y el dominio catalítico<sup>4</sup>. Éstas son sintetizadas como zimógeno con un péptido señal, que las conduce a la vía secretoria, una vez fuera pueden ser enviadas al espacio extracelular o anclarse a la membrana plasmática donde realizan su actividad catalítica. Tienen la capacidad de degradar

todos los componentes de la matriz extracelular y se encuentran en todos los organismos tanto eucariontes como procariontes.

Por lo menos se han identificado 25 MMP's en vertebrados, de los cuales 24 genes están presentes en humanos, incluyendo dos genes duplicados recientemente que codifican para MMP-23, identificados en el cromosoma uno<sup>5</sup>.

Las actividades proteolíticas de las MMP's influyen en procesos celulares esenciales como proliferación celular, migración y adhesión, así como algunos eventos fisiológicos fundamentales que están involucrados en la remodelación del tejido: angiogénesis, desarrollo de huesos, involución uterina y mamaria, así como también participar en la cicatrización. Mantienen la homeostasis celular, procesando, activando o desactivando una gran variedad de factores solubles y regulando la actividad de mediadores de las vías inflamatorias<sup>6,7</sup>.

La actividad proteolítica de las MMP's puede ser regulada a tres niveles: 1) Expresión génica, 2) Procesamiento de la proenzima e 3) Inhibición de la actividad enzimática<sup>8</sup>.

Se han involucrado dos principales mecanismos en la activación de las MMP's. Uno es el corte proteolítico con la remoción del prodominio y el otro es la activación alostérica donde el prodominio es desplazado del sitio catalítico de las enzimas sin ser cortado<sup>4</sup>.

Al remover el prodominio, éste se deslocaliza del sitio catalítico lo que ocasiona la activación de la enzima; diversos agentes como organomercuriales, especies reactivas de oxígeno, y agentes S-reactivos pueden interactuar con la cisteína conservada en el prodominio dejando expuesto al ion zinc. La inducción de cambios conformacionales a través de la unión de agentes caotrópicos y detergentes como SDS son seguidos por la degradación del prodominio<sup>4</sup>.

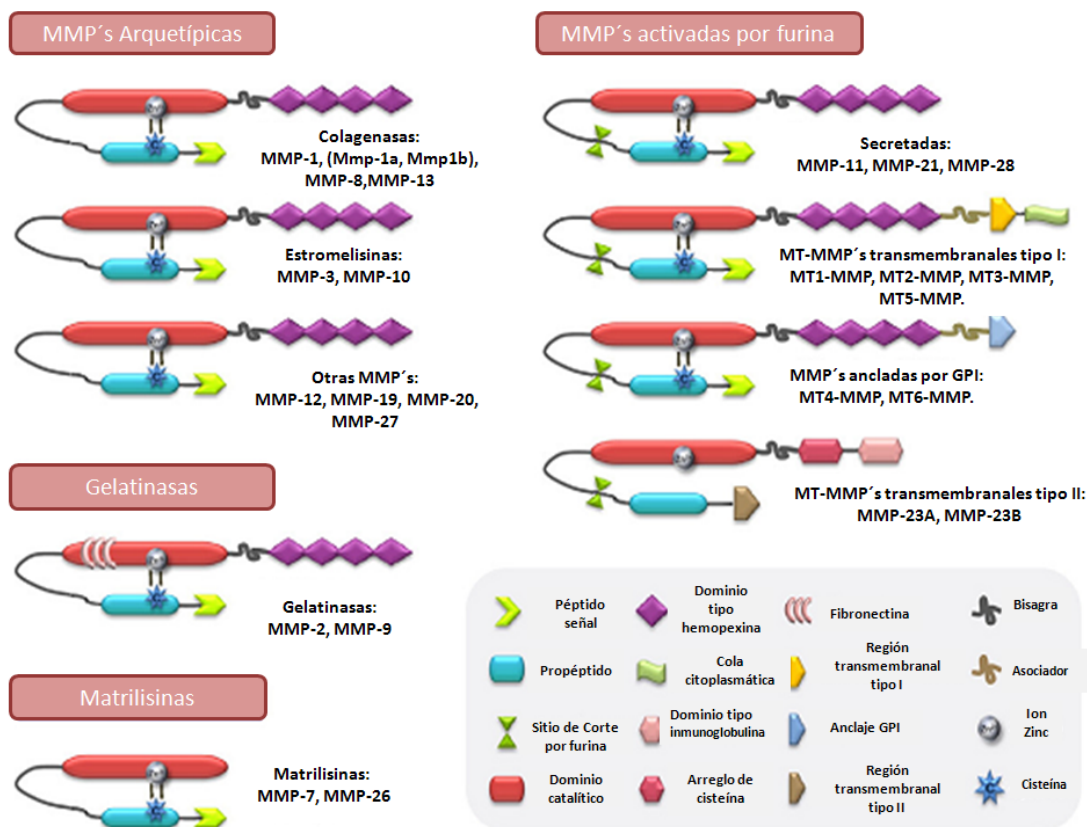
La activación alostérica es la unión de macromoléculas o reactivos específicos de unión a grupos tiol de la región de una MMP con prodominio intacto o parcialmente cortado el cual puede inducir la activación de la enzima a pesar de la presencia de la secuencia PRCGXPD. Estos pueden ser HgCl<sub>2</sub>, APMA, lipocalina asociada a gelatina de neutrófilos, en el caso de proMMP-9 esta puede ser activada por colágena IV y gelatina, SIBLINGS los cuales se asocian fuertemente a las formas pro y activas de MMP's, sialoproteína se asocia a MMP-2, osteopontina se asocia a MMP-3 y la proteína 1 de matriz de dentina se asocia a MMP-9.

Los TIMP's, son proteínas secretadas que específicamente y de manera reversible inhiben a las MMP's. Otros inhibidores conocidos son: la proteína 1 de matriz extracelular la cual es una glicoproteína de aproximadamente 85 kDa con una amplia distribución en tejidos la cual ha sido correlacionada con cambios en los componentes de matriz extracelular<sup>9</sup> y la glicoproteína

anclada a membrana RECK la cual tiene un peso molecular de 110 kDa, posee dominios similares a inhibidores de serin proteasas y está asociada a la membrana celular a través de una modificación en el carboxilo terminal del GPI<sup>8</sup>.

Sin embargo la gran relevancia de esta familia de proteasas principalmente deriva del gran número de condiciones patológicas donde estas enzimas han sido implicadas. Así la desregulación de MMP's ha sido reportada en cáncer, enfermedades vasculares y algunas patologías del tipo inflamatorio<sup>5</sup>.

Basados en la organización de sus dominios se pueden clasificar en cuatro diferentes grupos: MMP's arquetípicas, matrilisinas, gelatinasas, y MMP's activadas por furina (Figura 1).



**Figura 1.** Clasificación de las metaloproteinasas de acuerdo a la organización de sus dominios (imagen modificada)<sup>5</sup>.

### II.II.I. Metaloproteinasas arquetípicas

Las MMP's arquetípicas de acuerdo a la especificidad de sustrato, se pueden establecer en tres diferentes subgrupos: colagenasas, estromelisinias y otras MMP's arquetípicas<sup>5</sup>.



### **II.II.II. Matrilisinas**

En el caso de matrilisinas dentro de éstas son conocidas la MMP-7 y MMP-26, las cuales son expresadas durante condiciones normales y patológicas siendo implicadas en la progresión de cáncer humano. Ambas proteasas exhiben la misma disposición de arreglo de dominio de todas las MMP's sólo que carecen de dominio hemopexina en el carboxilo terminal <sup>5</sup>.

### **II.II.III. Gelatinasas**

Las gelatinasas MMP-2 (Gelatinasa A) y MMP-9 (Gelatinasa B) se expresan constitutivamente por algunos tipos celulares: fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, condrocitos y monocitos en el caso de MMP-2; mientras que macrófagos alveolares, leucocitos polimorfonucleares y osteoclastos expresan MMP-9. Estas MMP's tienen un dominio adicional de fibronectina localizado dentro del dominio catalítico que permite la unión y el procesamiento de colágena desnaturalizada o gelatina.

### **II.II.IV. Metaloproteinasas activadas por furina**

Las MMP's activadas por furina poseen un motivo de reconocimiento a furina insertado entre el propéptido y el dominio catalítico. Esta secuencia es reconocida y cortada por la furin convertasa la cual es una serin proteinasa que pertenece a la familia de las convertasas que puede cortar el prodominio en la posición carboxilo terminal en la secuencia (RX [K/R] R) <sup>4</sup>, proporcionando las bases para la activación dependiente de furina de enzimas latentes priorizadas a secreción. Estas MMP's activadas por furina incluyen tres MMP's secretadas, cuatro MMP's tipo membrana y dos MMP's transmembranales tipo II.

A diferencia de otras MMP's secretadas MMP -11, MMP-21 y MMP-28 son enzimas furin activables que son procesadas intracelularmente por proteasas tipo furina y secretadas como forma activa <sup>4</sup>.

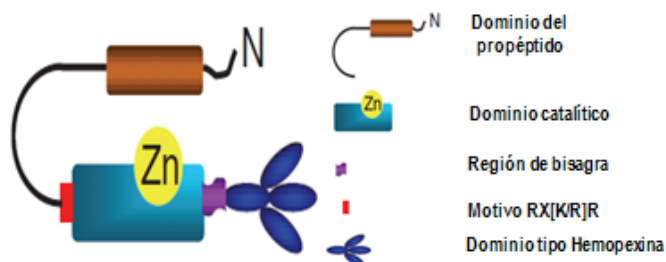
El dominio estructural que tienen las MMP's secretadas es: un péptido señal que conduce a la proteína al retículo endoplásmico, el péptido señal es seguido por un dominio propéptido amino terminal que posee una secuencia conservada PRCGXPD que mantiene el zimógeno inactivo, ya que el residuo conservado de cisteína interactúa con el ion zinc, lo que evita la actividad catalítica por lo tanto el péptido será activado hasta ser cortado proteolíticamente, a este mecanismo se le ha llamado el *switch* de cisteína; seguido de este hay un dominio catalítico con una secuencia conservada HEXHXXGXXH donde las tres histidinas presentes juegan un papel esencial ya que es el sitio de unión al ión zinc el cual es crítico para la actividad

catalítica; los aminoácidos específicos junto con el dominio catalítico definen la especificidad del sustrato por la interacción con un limitado subconjunto de sustratos únicamente, ésta es además determinada por los sitios de unión a sustrato localizados fuera del dominio catalítico llamados exositos. El dominio catalítico en muchas MMP's es seguido por un vinculador rico en prolina, la región de bisagra. Está unida a su vez a un dominio de hemopexina carboxilo terminal que adopta una estructura tridimensional asemejando una hélice de cuatro palas que es muy importante para determinar el reconocimiento del sustrato y la interacción con inhibidores endógenos <sup>3,7</sup>.

#### II.II.IV.I. Epilisina o MMP-28

La metaloproteinasa de matriz 28 o también conocida como epilisisina es el miembro más reciente de las MMP's y aparentemente el último miembro de la familia de las MMP's en mamíferos <sup>10</sup> la cual pertenece a las metaloproteinasas secretadas <sup>11</sup>.

Su nombre se debe a que su expresión es predominante en epitelio de tejidos <sup>10</sup>, fue clonada por primera vez a partir de queratinocitos y testículo humanos<sup>15</sup> y cDNA a partir de pulmón <sup>7</sup>. El cDNA posee un marco abierto de lectura de 1560 nucleótidos codificantes para una proteína de 520 aminoácidos <sup>7</sup>. La proteína contiene todos los dominios típicos de una MMP; una secuencia señal hidrofóbica que es seguida por el prodominio incluyendo una secuencia PRCGVTD (PRCGVAD en ratón). Posee un sitio funcional de reconocimiento del tipo furina RKKR el cual es localizado en el sitio carboxilo terminal del prodominio indicando que epilisisina puede ser activada de manera intracelular por la proteína furin convertasa<sup>7</sup>, le precede el dominio catalítico, característico para las MMP's solubles, la secuencia catalítica HEIGHTLGLTH es única en epilisisina ya que contiene treonina, se sabe que este sitio posee gran similitud entre humano y ratón conservando el 85% de aminoácidos<sup>13</sup>. Una región de bisagra de 39 aminoácidos es seguida por un dominio típico de hemopexina<sup>7</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Estructura de MMP-28 o epilisisina.** Se ilustra el dominio del propéptido, el dominio catalítico, la región de bisagra, el dominio tipo hemopexina y el motivo RKKR que es el sitio de corte por la proteína furin convertasa (imagen modificada)<sup>4</sup>.

Se ha identificado que el prodominio de epilisina humana posee una secuencia YGYL que es conservada tanto en la proteína de ratón como en *Xenopus laevis*<sup>7</sup>. Esta secuencia es común a todas las MT-MMPs, pero entre otras MMP's secretadas únicamente MMP-19 contiene esta secuencia, la cual junto con epilisina está relacionada con las MMP's de insecto y ambas son evolutivamente conservadas<sup>12</sup>. Sin embargo no hay funciones reportadas para la secuencia YGYL, en otras MMP's se ha reportado estar en el prodominio de MT1-MMP (MMP-14) donde se ha propuesto que esta secuencia le confiere al prodominio funcionar como chaperona regulando el plegamiento y tráfico de la enzima, común en todas las MT-MMP's<sup>7</sup>.

Epilisina es una proteína de 58 kDa al poseer un propéptido que lo inactiva y 48 kDa en su forma activa<sup>13</sup>, aunque en células MDCK se ha citado un peso de 50kDa en su forma activa sin procesar bajo condiciones libres de suero mientras que en células cultivadas con suero fue procesada a la forma de 48 kDa<sup>12</sup>. En células HeLa se ha reportado un peso de 60 kDa para la proforma, 44.9 kDa para la forma activa y 26.7 kDa para el dominio carboxilo terminal; en la línea celular de condrosarcoma SW1353 al transfectarle epilisina de manera estable, la proforma y la forma activa tienen un peso de 58 kDa y 50 kDa respectivamente<sup>14</sup>. Posee tres diferentes transcritos (2.6, 2.0 y 1.2 kb)<sup>15</sup> y puede ser detectado mediante análisis de Northern blot en varios tejidos debido al *splicing* alternativo, esto sugiere que epilisina participa en la homeostasis de los tejidos<sup>16,7</sup>.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de epilisina (MMP-28) con otras MMP's indica que esta enzima está más relacionada con otro miembro relativamente reciente MMP-19, ya que posee un porcentaje de identidad de residuos del 46% y similitud del 60% con respecto al dominio catalítico de MMP-19<sup>6</sup>. El gen de epilisina se localiza en el cromosoma 17 (17q11.2), un locus que difiere de otros genes de *mmp* reportados. Tiene una única organización genética estructural que se compone de siete intrones y ocho exones en vez de diez, que es típico para genes de *mmp*<sup>7</sup>.

#### **II.II.IV.II. Expresión de Epilisina**

Se ha demostrado que el ARNm de epilisina es altamente expresado en tejidos humanos bajo condiciones normales, en testículo y pulmón, a bajos niveles en corazón, intestino, cerebro, varios tejidos fetales, en el riñón adulto y páncreas<sup>15,7</sup>. La distribución de epilisina en tejido pulmonar detectado a partir de ARNm de ratón parece ser la contraparte humana ya que en el tejido humano adulto la expresión más prominente ha sido detectada en testículo mientras que en el de ratón adulto ha sido detectada en células epiteliales bronquiolares de pulmón llamadas células de Clara<sup>7,10</sup>.

Se encuentra expresada en BMDM, pero no en macrófagos alveolares, sugiriendo que la expresión por parte de macrófagos es dependiendo de la localización y diferenciación <sup>10</sup>.

Su patrón de expresión se distingue de otros miembros de la familia de metaloproteinasas, ya que muchas MMP's son expresadas únicamente bajo condiciones excepcionales así como aquellos relativos a daño, inflamación o enfermedad, en cambio el patrón de expresión de epilisina implica su homeostasis en tejido normal ya que también se expresa de manera basal en condiciones normales <sup>7</sup>.

En cultivo celular se expresa de manera endógena en queratinocitos HaCat, queratinocitos primarios, neuronas en desarrollo y diversas líneas celulares transformadas como lo es la línea celular A549. Se encuentra sobreexpresada en el proceso de cicatrización en queratinocitos basales distales del borde de herida, en asociación con la membrana basal intacta y en respuesta a TNF- $\alpha$  <sup>12</sup>.

La sobreexpresión de epilisina en células MDCK conduce a una reducción de matriz extracelular basolateral observada por la desaparición de colágena tipo IV, laminina y fibronectina, éstos componentes de matriz extracelular a su vez se encuentran de manera reducida en células que expresan epilisina bajo condiciones libres de suero así como también se vio reflejada la degradación de colágena tipo IV dando soporte a la idea de que la activación de proteólisis es dada por MMP-28.

Epilisina es expresada durante procesos patológicos como en diferentes carcinomas. Entre las 24 MMP's humanas conocidas, epilisina, MT1-MMP y MMP-2 están altamente expresadas en carcinoma urotelial, donde sus niveles de transcripción correlacionan con el grado de cáncer. Se ha identificado en carcinoma de células invasivas ductales de mama, en carcinoma de células escamosas orales y a su vez las células derivadas de este carcinoma fueron capaces de la formación de colonias, anclaje y crecimiento independiente de acuerdo de la expresión de epilisina. Células A549 de carcinoma pulmonar bajo el estímulo con TGF-beta mediaron el estado de transición epitelio mesénquima, al ser transfectadas de manera estable con epilisina adoptando un fenotipo invasivo <sup>12</sup>.

Así también se ha demostrado su expresión en células y matriz extracelular de discos intervertebrales humanos en diversas edades correlacionado y proporcional con el grado de daño, a mayor degeneración de los discos intervertebrales mayor la expresión de MMP-28 <sup>17</sup>.

Células de condrosarcoma SW1353 (obtenidas en la clínica Scott and White, en Texas por A. Leibovitz en 1977 proveniente del condrosarcoma primario de grado II del húmero derecho de una mujer caucásica de 72 años) <sup>37</sup> demuestran cambio en morfología al sobreexpresar

MMP-28 transfectándolas de manera estable comparada con las células control transfectadas con el vector vacío, debido a cambios en la estructura del citoesqueleto por estrés en la formación de fibras de actina<sup>14</sup>.

#### **II.II.IV.III. Ratón deficiente de Epilisina**

A pesar de que MMP-28 se expresa de manera constitutiva en tejidos normales, el ratón nulo de epilisina (Mmp-28<sup>-/-</sup>) no tuvo algún cambio de fenotipo. Sin embargo, al usar un modelo murino de neumonía con *Pseudomonas aureginosa* los ratones demostraron un incremento temprano en el reclutamiento de macrófagos a los pulmones así como un aumento en la eliminación bacteriana y reducida neutrofilia pulmonar, debido al acelerado flujo de macrófagos. Además los macrófagos derivados del ratón Mmp28<sup>-/-</sup> migran más rápido que los del ratón silvestre, indicando que epilisina funciona como un regulador negativo del reclutamiento de macrófagos retardando la quimiotaxis de estas células<sup>10</sup>.

#### **II.III. Aparato respiratorio**

El aparato respiratorio está compuesto por los dos pulmones y una serie de vías aéreas que los comunican con el exterior. A medida que estas vías aéreas se introducen en la profundidad del pulmón, se ramifican en conductos de calibre cada vez menor, hasta alcanzar los espacios aéreos llamados alveólos. El aparato respiratorio tiene tres funciones principales: la conducción del aire, la filtración del aire y el intercambio (respiración). Este último proceso ocurre en los alveólos. Además el pasaje del aire por la laringe se emplea para producir el habla y el pasaje del aire por la mucosa olfatoria de las cavidades nasales, transporta los estímulos para el sentido del olfato.

Las vías aéreas están formadas por una porción conductora y una porción respiratoria, la porción conductora se compone de las vías aéreas que conducen hasta los sitios de la respiración dentro del pulmón, donde ocurre el intercambio gaseoso. Las vías conductoras incluyen las que se localizan por fuera y dentro de los pulmones, las cuales comprenden: las cavidades nasales, la nasofaringe, orofaringe, laringe, tráquea y los dos bronquios principales, dentro de los pulmones se encuentran los bronquios internos, que se ramifican extensamente y dan origen a los bronquiolos de distribución. Éstos representan la porción terminal de las vías aéreas de conducción. En conjunto, los bronquios internos y los bronquiolos reciben la denominación de árbol bronquial. La porción respiratoria es la parte de la vía aérea en la cual se produce el intercambio gaseoso. En consecuencia incluye: los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares, los sacos alveolares y los alveolos.

Los vasos sanguíneos ingresan al pulmón junto con el bronquio. Las arterias se ramifican en vasos de menos calibre a medida que siguen el árbol bronquial hasta el interior del pulmón. Los capilares se ponen en íntimo contacto con las unidades respiratorias terminales, los alveolos. Esta íntima relación entre los espacios aéreos alveolares y los capilares pulmonares representa la base estructural del intercambio gaseoso dentro del parénquima pulmonar.

El aire que atraviesa las vías respiratorias debe ser acondicionado antes de alcanzar las unidades respiratorias terminales. Este acondicionamiento del aire se produce en la porción de conducción y consiste en calentarlo, humedecerlo y eliminar las partículas que pudieran arrastrar. El moco y las secreciones serosas desempeñan un papel fundamental en el proceso de acondicionamiento. No sólo humedecen el aire, sino además atrapan las partículas no captadas por los cortos y gruesos pelos especiales, las vibrisas, de las cavidades nasales. El moco, acrecentado por las secreciones de las glándulas serosas, también impide la deshidratación de la capa subyacente del epitelio, debido al aire en movimiento <sup>18</sup>.

#### **II.III.I. Neumonitis por Hipersensibilidad**

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) ó Alveolitis Alérgica Extrínseca (AAE) es un síndrome multifactorial complejo con historia y presentación clínica variable la cual es ocasionada por la exposición prolongada a partículas orgánicas conocidas <sup>19</sup>, afectando de manera primaria a los alveólos (de ahí el sinónimo alveolitis alérgica) <sup>20</sup>.

Fue originalmente descrita en 1713 por Ramazzini como una enfermedad pulmonar ocupacional en trabajadores de grano y posteriormente en 1932 aparece una descripción detallada de la patología en granjeros que inhalaban heno mohoso contaminado de *actinomicetes* termofílicos, de ahí deriva el término pulmón de granjero, y así dependiendo de la partícula que la genera, ha tenido diversas denominaciones <sup>21</sup>, pulmón del trabajador de hongos, pulmón del aire acondicionado, del trabajador de detergentes, de los descortezadores de arce, del cuidador de roedores, del cuidador de aves y suberosis, si es generada por partículas de corcho <sup>22</sup>.

Se incluyen aquellas partículas producidas por cualquier tipo de organismo: entre las bacterias, las más comunes son actinomicetes termofílicos, que son bacilos filamentosos gram positivos que proliferan en temperaturas con un rango entre 50-60 °C. También se incluyen proteínas de animales y plantas, como aquellas contenidas en suero, heces, plumas y aves en eclosión (polvo seroso que cubre las plumas de palomas recién eclosionadas) <sup>23</sup>, donde es mucho más agresivo si se trata de pericos o canarios que si fueran palomas o gallinas <sup>19</sup>.

La distribución de las causas de NH puede depender de la localidad y la población, por ejemplo, en México el desorden más común es la enfermedad de los cuidadores de aves,

mientras que en Japón es más común la neumonitis por hipersensibilidad tipo verano la cual se origina por la inhalación de mohos estacionales que contaminan las casas durante las épocas calurosas y húmedas como en verano <sup>23</sup>.

No es necesario que la exposición provenga de organismos vivos ya que se sabe que la exposición a almohadas y edredones de plumas desencadenan la patología; así como también aquellas partículas provenientes del polvo de la concha de los moluscos usadas para hacer botones, y aquellas partículas provenientes de animales usados en la manufactura del vestido <sup>23</sup>.

En el caso de proteínas de plantas se incluyen las contenidas en comida Japonesa que contiene harina de una raíz tuberosa como la de los tubérculos llamada *Konjak* y polvo derivado de *Hijikia* fusiforme, la cual es un alga café, así como también hongos (*Saccaromyces rectivirgula*) y protozoarios <sup>23</sup>.

La exposición a estas partículas genera un proceso inflamatorio exacerbado a causa de la inducción inmunológica generada por la inhalación de partículas pequeñas (menores a 5µm) que llegan al parénquima pulmonar <sup>24</sup> ocasionando un infiltrado y proliferación de macrófagos pulmonares activados y linfocitos, dando como resultado alveolitis linfocítica y bronquiolitis. Los síntomas que caracterizan esta patología son: disnea, tos, sudores nocturnos, pérdida de peso y producción de esputo <sup>23</sup>.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) el cual es un centro de referencia nacional en México, se reciben anualmente un promedio de 60 casos nuevos, la mayoría de ellos son mujeres que conviven en el hogar con aves domésticas, especialmente palomas <sup>22</sup>.

La incidencia en Reino Unido de 1992 a 2001 ha estimado 50 casos de NH anualmente, representando 1.8% de todos los casos de enfermedades respiratorias relacionadas al trabajo de acuerdo a neumólogos <sup>21</sup>.

Al parecer es indispensable la existencia de varios factores que actúen al mismo tiempo o en forma secuencial para que se desencadene la patología <sup>19</sup> ya que una pequeña proporción de individuos expuestos la desarrollan <sup>25</sup>.

La patogénesis es modificada por polimorfismos genéticos localizados dentro del MHC <sup>26</sup>, así como haplotipos de MHC clase II y de polimorfismos en el transportador asociado con el procesamiento de antígeno (TAP) los cuales son genes implicados como factores de riesgo a

desarrollo de NH <sup>27</sup>. Los episodios sintomáticos recurrentes se pueden presentar de cuatro a ocho horas después de la exposición a estas partículas <sup>25</sup>. Los lavados broncoalveolares demuestran un aumento mayor al 25 % de linfocitos (linfocitosis) en una proporción CD4 menor al 1.0 % y CD8 mayor al 1.0% <sup>25</sup>. También la presencia de macrófagos alveolares contribuye a la respuesta inmune produciendo altos niveles de Interleucina-8 (IL-8) la cual es un potente quimioatrayente de neutrófilos. Los neutrófilos secretan a su vez una gran variedad de moléculas implicadas en la evolución de la inflamación difusa pulmonar que ocurre durante el desarrollo de la NH <sup>28</sup>.

Las características histológicas en las biopsias de pulmón demuestran bronquiolitis linfocítica, infiltrados intersticiales y células gigantes de cuerpo extraño que son el resultado de la acumulación de macrófagos que fagocitan partículas dañinas para el pulmón <sup>29</sup>.

De acuerdo al tiempo de exposición o evolución, la NH o AAE se puede clasificar de diversas formas donde destacan tres etapas: aguda, subaguda y crónica donde esta última puede llegar a desencadenar focos de fibrosis con destrucción de parénquima pulmonar que tiene efectos irreversibles e irreparables para la morfología del pulmón <sup>24</sup> así como también puede llegar a desarrollar enfisema, o enfisema y focos de fibrosis de manera simultánea <sup>23</sup>.

Se sabe que las enfermedades pulmonares intersticiales son desencadenadas por un daño inicial que provoca un proceso inflamatorio el cual si no se resuelve hay proliferación y activación de fibroblastos y por lo tanto acumulación de matriz extracelular <sup>30</sup>, la cual es regulada a su vez por la acción de las metaloproteinasas.

Debido a que se sabe muy poco de la presencia, los efectos y el modo de acción de MMP-28 en pulmón, resulta interesante analizarla en NH, ya que se ha reportado sobreexpresada en otras enfermedades pulmonares como lo es la Fibrosis Pulmonar Idiopática, de acuerdo a análisis de microarreglos <sup>3</sup>.



### **III. Objetivos**

- Mediante qPCR, determinar el nivel de expresión de epilisina en tejido pulmonar de pacientes con NH y control normal.
- Detectar la ubicación tisular de epilisina en tejido pulmonar con NH y control normal mediante análisis inmunohistoquímico.

## **IV. Material y Método**

### **IV.I. Obtención de muestras y población de estudio**

El material biológico utilizado para este proyecto fue proporcionado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas, y el proyecto fue aprobado por su comité ético con consentimiento escrito de los pacientes. El diagnóstico de NH se basó en el consenso de la Sociedad Americana de Tórax (*American Thoracic Society*) y la Sociedad Europea Respiratoria (*European Respiratory Society*) confirmada por biopsia pulmonar. Las muestras incluyen 14 laminillas de tejido pulmonar embebido en parafina, diez de ellos son tejidos con NH y cuatro son tejidos sanos, diez biopsias de tejido de pacientes con NH, y una muestra de pulmón normal (control) obtenida de una lobectomía para la remoción de un tumor pulmonar primario. Dos muestras de ARN de pulmón normal fueron adquiridas comercialmente (Ambion, Austin TX, datos del pulmón no proporcionados), (Stratagene Sta. Clara California, pulmón adulto de 58 años). También se analizó epilisina en la línea celular de carcinoma de células alveolares de neumocitos tipo II llamada A549 (American Type Cell Culture, EUA), la cual fue originalmente aislada de un hombre caucásico de 53 años.

### **IV.II. PCR en tiempo real (qPCR)**

#### **IV.II.I. Extracción de ARN a partir de tejido pulmonar normal y con NH**

Se extrajo ARN total utilizando el kit TRIzol Reagent (Invitrogene, Carlsbad CA), donde se agregó 1 mL de reactivo TRIzol (el cual contiene fenol e isocianato de guanidina) por cada 100 mg de tejido, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante cinco minutos, seguido de la adición de cloroformo frío (200  $\mu$ L de cloroformo por cada mL de TRIzol utilizado), se agitaron durante dos minutos, se centrifugaron a 10 000 rpm a 4°C por 15 minutos, se recuperó la fase acuosa transfiriéndola a otros tubos, se adicionó un volumen igual al recuperado de isopropanol frío, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm a 4°C por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación y se resuspendieron en un mL de etanol al 75% frío, se centrifugaron por última vez a 10 000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el botón formado se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se resuspendieron en agua DEPC

(dietilpirocarbonato al 0.1 %), adicionando de 10 a 15  $\mu$ L. Las muestras de RNA obtenidas se cuantificaron en Nano Drop (Tabla 1.) (Thermo Scientific Wilmington, DE) y se tomo el volumen necesario para obtener 1  $\mu$ g de RNA.

**Tabla 1. Concentraciones de ARN extraído a partir de tejido pulmonar con NH y normal.**

<b>Muestra</b>	<b>Concentración de RNA (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L) necesario para tener un <math>\mu</math>g de RNA</b>
NH	653	1.53
NH	931.5	1.07
NH	1084.7	0.92
NH	1407.3	0.71
NH	1849	0.54
NH	1100	0.91
NH	2304	0.43
NH	404	2.47
NH	460	2.17
NH	1902	0.52
PN	2280	0.439

#### **IV.II.II. Síntesis de cDNA's de tejido pulmonar normal y con NH**

El RNA extraído fue utilizado para generar cDNA's. Para la obtención de cDNA a partir de ARN se agregó desoxirribonucleasa I (DNAsa I) (Invitrogen, USA) para degradar el ADN genómico presente, por cada microgramo obtenido de ARN se le agregó 1  $\mu$ L de DNAsa y un 1  $\mu$ L de buffer 10x, posteriormente cada muestra de ARN se aforó a 10  $\mu$ L con agua DEPC.

Las muestras se incubaron en el termociclador durante 15 minutos a 25 °C, antes de que bajara la temperatura se detuvo la incubación y por cada muestra de ARN se agregó 1  $\mu$ L de ácido EDTA 25 mM, el cual es un agente quelante; se incubaron las muestras a 64°C por 10 minutos para desnaturalizar la DNAsa e inactivarla, se agregaron 1.5  $\mu$ L de agua DEPC y 1  $\mu$ L de hexámeros al azar 20  $\mu$ M (Kit Clontech, CA).

Posteriormente se incubaron 70°C por 2 minutos. Se le adicionó la mezcla de reacción (Clontech Mountain View CA) encargada de sintetizar el cDNA (Véase apéndice, Tabla 1).

Una vez hecha la mezcla de reacción, las muestras se incubaron en el termociclador a 42°C una hora y después a 94°C cinco minutos para detener la reacción, finalmente se agregaron 80 µL de agua DEPC. Para comprobar la calidad del cDNA sintetizado se hizo ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores o iniciadores para la proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa GAPDH (Life Technologies, EUA) la cual es una proteína constitutiva, importante en el metabolismo de carbohidratos.

Los cebadores poseen las siguientes secuencias:

Cebador sentido: CCC CTT CAT TGA CCT CAA CT

Cebador antisentido: TTG TCA TGG ATG ACC TTG GC

Se usaron los siguientes volúmenes para la mezcla de reacción:

**Tabla 2. Mezcla de reacción para amplificación de gen GAPDH**

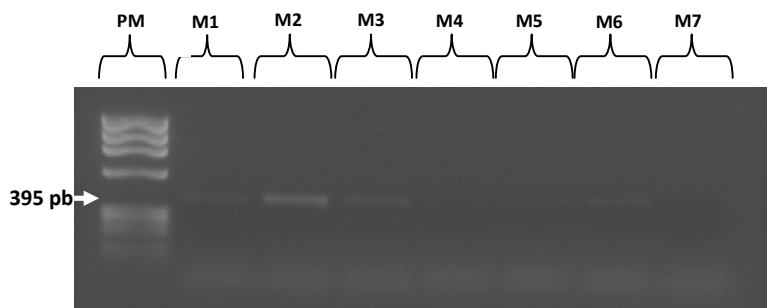
Mezcla de reacción PCR	1x (µL)
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.0
Buffer 10x	2.5
Cebador sentido GAPDH (10 µM)	1.5
Cebador antisentido GAPDH (10 µM)	1.5
dNTP's 10 mM	1.25
DNA polimerasa 5 U/µL (Enzima Taq Platinum. Invitrogen)	0.25
Agua DEPC	14

Con los siguientes ciclos en el termociclador:

**Tabla 3. Ciclos para amplificación de gen gapdh**

94 °C	94°C	60°C	72°C	72°C
2´	20 ´´	20´´	25´´	5´

El producto final de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio (Figura 3) obteniendo como resultado una banda específica con una longitud esperada de 395 pb.



**Figura 3. Amplicón de gen GAPDH.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio en el que se observan algunas de las muestras amplificadas mediante PCR para visualizar el gen GAPDH de cDNA sintetizado a partir de ARN de tejido pulmonar de pacientes con NH y control normal. El producto del amplicón tiene una longitud de 395 pb. Carril 1 contiene 1  $\mu$ L del marcador de pesos moleculares (PM), carriles M1-M6 son muestras, el carril M7 es control negativo al cual se le agregó la mezcla de reacción sin cDNA, sólo agua dde.

#### IV.II.III. Purificación de los productos de PCR para MMP-28 y 18s

Para llevar a cabo qPCR se aislaron amplicones obtenidos de una reacción de PCR, tanto para el amplicón de MMP-28 (Applied Biosystem, CA) como para el amplicón de la subunidad ribosomal 18s (Applied Biosystem, CA) el cual fue usado como referencia de ajuste al compararlo con el nivel de expresión de MMP-28 ya que la subunidad ribosomal 18s se expresa constitutivamente. El PCR se hizo a partir de cDNA de células A549, el modelo celular tiene la ventaja de ser de células epiteliales provenientes de pulmón, así como el expresar MMP-28 de manera endógena y la subunidad ribosomal 18s en condiciones basales. Cada ensayo se hizo de manera individual con los siguientes ciclos de amplificación:

**Tabla 4. Ciclos de amplificación para MMP-28 y 18s**

<b>94°C</b>	<b>95 °C</b>	<b>60°C</b>	<b>72°C</b>	<b>4°C</b>
<b>2´</b>	<b>15 ´´</b>	<b>1´</b>	<b>5´</b>	

Para visualizar cada amplicón obtenido se corrieron las muestras mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.5 %. Tomando en cuenta que el tamaño de los amplicones para MMP-28

son 117 pb y para 18s son 187 pb, se aislaron las bandas del gel total para continuar con la purificación de DNA obtenido.

Para purificar el DNA del gel se utilizaron dos tipos de columnas de separación, aquellas en el que la columna de separación es hidratable (Princeton Separations NJ) (véase apéndice) y aquella donde la columna es montable (Millipore Billerica MA).

A partir de las columnas hidratables obtuvimos las siguientes concentraciones:

**Tabla 5. Purificación de cDNA para Epilisina y la subunidad 18s por duplicado a partir de columnas Princeton Separations.**

Muestra	Concentración [ng/μL]
Epilisina 1	6.4
Epilisina 2	4.5
18s 1	24.7
18s 2	13.3

Para hacer la purificación de DNA con las columnas Millipore se coloca dentro de la columna el amplicón que está inmerso en el gel y se centrifuga a 6250 rpm durante diez minutos. El volumen recuperado son los amplicones purificados de los cuales se obtuvieron las siguientes concentraciones y las siguientes absorbancias:

**Tabla 6. Purificación de cDNA para Epilisina y subunidad 18s por duplicado con columnas Millipore.**

Muestra	Concentración [ng/μL]	Absorbancia (260/280 nm)
Epilisina (MMP-28)	19.05	1.6
Epilisina (MMP-28)	21.7	1.74
18s 1	14	1.67
18s 2	9.3	1.58

Es recomendable tener una absorbancia  $\geq 1.7$  ya que una lectura cercana a este rango asegura el tener menor contaminación producida por proteínas y por lo tanto mayor pureza de cDNA. Dentro de las muestras de Epilisina decidimos usar la muestra con absorbancia de 1.74 en cuanto a la subunidad 18s decidimos usar la de absorbancia de 1.67.

Para determinar la pureza de nuestro cDNA purificado decidimos hacer PCR con Sonda Taq Man añadiendo 1,2 y 3  $\mu\text{L}$  de cDNA, con el fin de asegurarnos que el cDNA amplificara con los cebadores de la sonda respectiva para MMP28 y para 18s.

Las condiciones para el PCR son las siguientes:

**Tabla 7. Condiciones de PCR para MMP-28 y 18s**

94°C	95 °C	60°C	72°C	4°C
2'	15 "	1'	5'	$\infty$

35 ciclos

Al correr nuestras muestras en gel de agarosa observamos el amplicón esperado de 187 pb para 18s sin la presencia de productos inespecíficos (resultados no mostrados).

#### IV.II.IV. Curva patrón

Para poder cuantificar el número de copias presentes en nuestras muestras problema fue necesario obtener una curva de referencia hecha de cDNA de células A549 ajustando a determinado número de copias a partir de diluciones con un número de copias definido.

A partir de la ecuación 1 (véase apéndice), se obtuvieron los siguientes resultados:

Fueron necesarios 14.7  $\mu\text{L}$  de cDNA 18s para obtener  $1 \times 10^{10}$  copias/ $\mu\text{L}$ , este volumen se aforó a 100  $\mu\text{L}$  con 85.3  $\mu\text{L}$  de agua DEPC.

A partir de esta solución se pueden hacer diluciones seriales para obtener  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  copias en cada volumen de 100  $\mu\text{L}$ , tomando 10  $\mu\text{L}$  de la solución inicial y aforando a 100  $\mu\text{L}$  con 90  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, y así sucesivamente hasta obtener las 10 diluciones.

Para obtener la curva de MMP-28 se tomó en cuenta la concentración con absorbancia de 1.74 la cual contenía 21.7 ng/ $\mu\text{L}$ , determinando un volumen final de 5.9  $\mu\text{L}$  para obtener  $1 \times 10^{10}$  copias/ $\mu\text{L}$  aforado a 100  $\mu\text{L}$  con 94.1  $\mu\text{L}$  de agua DEPC.

También se hicieron las respectivas diluciones seriales a partir de esta solución.

El experimento se montó dos veces, en cada experimento las curvas se colocaron por triplicado con ocho puntos omitiendo las diluciones  $10^1$  y  $10^9$ , para determinar el nivel de expresión de 18s se montó la curva y cada muestra a analizar por triplicado incluyendo cDNA proveniente de tejido pulmonar sano y cDNA proveniente de tejido con NH.

La mezcla de reacción utilizada para MMP-28 fue la siguiente:

**Tabla 8. Mezcla de reacción para montaje de qPCR**

Mezcla de reacción	1x (µL)	50x (µL)
Buffer PCR 10x	1.0	50
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0.8	40
dNTP's 4 mM	0.5	25
DNA polimerasa (Enzima Taq. Platinum. Invitrogen)	0.1	5.0
Sonda Taq Man 20x	0.5	25
H <sub>2</sub> O DEPC	5.1	255
Volumen de reacción	8.0	400
cDNA	2	2 cada muestra
Volumen total	10	500

Cabe mencionar que la secuencia de cebadores de la sonda TaqMan (Applied Biosystems, Foster City CA) para MMP-28 y 18s no son proporcionados por la compañía de donde se adquirieron.

Las condiciones para el PCR fueron las siguientes:

**Tabla 9. Condiciones de PCR para MMP-28 y 18s**

94°C	94°C	60°C
2´	15"	1´

Se hizo el ensayo una vez más para MMP-28 con el objetivo de comparar los niveles de expresión con respecto a 18s. El ensayo se llevó a cabo con cDNA proveniente de tres muestras de tejido sano de pulmón y de diez pacientes con NH.



#### **IV.III. Inmunohistoquímica**

A partir de muestras de tejidos embebidos en parafina proveniente de diez pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad y cuatro muestras de tejido normal, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica. Las laminillas se desparafinaron con xilol, hidratando con concentraciones descendentes de etanol (100%, 95% y 50% respectivamente), se equilibró con agua, se eliminó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 30 minutos; las laminillas se colocaron en Buffer de Citratos (0.01 M de ácido cítrico a pH=6) y se incubaron en un horno de microondas para desenmascarar el antígeno ocho minutos a potencia seis; se dejaron enfriar 20 minutos y se hizo un lavado con PBS por cinco minutos.

Con el objetivo de generar mayor especificidad evitando que el anticuerpo pueda detectar epítopes inespecíficos las laminillas se bloquearon colocándolas en cámaras húmedas horizontales con bloqueador universal durante 10 minutos (Dilución 1:10; Biogenex, Norris Canyon Road, San Ramon, CA), se enjuagó cinco minutos en PBS y se incubó 30 minutos en suero de borrego (Chemicon, Australia) en una dilución de 1:100 en PBS.

El siguiente paso consistió en colocar el anticuerpo primario para el antígeno a detectar en este caso epilisina; el anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal obtenido de conejo (Novus Biologicals, USA) el cual se usó a una concentración de 5 µg/mL.

A los controles negativos no se les añadió anticuerpo primario; todas las laminillas se dejaron incubadas en suero de borrego 24 horas a 4°C. Se hizo un lavado con PBS+ tween-20 al 0.1% durante cinco minutos. Para detectar de manera específica al anticuerpo primario asociado al antígeno, todas las laminillas se incubaron con anticuerpo secundario durante 20 minutos el cual está ligado a biotina y tiene la función de adherirse al anticuerpo primario (Biogenex Multilink, Norris Canyon RD San Ramon CA).

Se colocó una señal de estreptavidina marcada con peroxidasa (Biogenex Multilink, Norris Canyon RD San Ramon. CA) la cual se une con la biotina, esta afinidad entre la biotina y la estreptavidina tiene una Kd de 10-14 M que permite detectar de una manera más específica la unión antígeno- anticuerpo.

Para definir en que zonas se formó el complejo antígeno-anticuerpo el tejido se reveló, agregando como cromógeno AEC (Biogenex, San Ramon CA), el cual es sustrato de la peroxidasa que desencadena una reacción enzimática colorimétrica en la que se hace visible el sustrato incoloro proporcionando una tinción rojiza, al estar la estreptavidina marcada con peroxidasa, la reacción colorimétrica ocurrirá únicamente en las zonas donde se haya formado

el complejo estreptavidina-biotina y por lo tanto anticuerpo secundario, anticuerpo primario y antígeno.

La reacción enzimática se llevó a cabo hasta que los tejidos se tiñeron con un tiempo de revelado dentro de un rango de 4-10 minutos de acuerdo al tejido, la reacción colorimétrica se detuvo con agua. Se contratiñó con hematoxilina (Biogenex, San Ramon CA) durante 10 segundos; éste se encarga de teñir núcleos, se viró la coloración de la hematoxilina oxidándola con bicarbonato de sodio para dar como resultado una coloración azulada, finalmente las laminillas se montaron con ayuda de cristal mount (Biomed, EUA) y se dejaron secando 15 minutos, se colocó una gota de resina y cubreobjetos.

#### **IV.IV. Cultivo celular, extracción nuclear y citoplasmática**

Debido a los resultados obtenidos en inmunohistoquímica, se cultivaron células epiteliales de pulmón de neumocitos tipo II de la línea celular A549 las cuales se conservaban criopreservadas en suero fetal bovino con DMSO al 10%, se sembraron en cajas T75 y se colocaron 8 mL de medio F12 con suero (Invitrogen USA). Una vez llevadas las cajas al 100% de confluencia, se colectó el medio con suero para analizar si MMP-28 es una proteína que se secreta de las células. Para la extracción nuclear y citoplasmática de células A549 se usó un kit de extracción nuclear (Fermentas Life Science, Canada), se adicionó 1 mL de PBS con inhibidor de proteasas frío a las células, con ayuda de un *scraper* se despegó la monocapa celular y se transfirió a un tubo eppendorf, se centrifugó a 250 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón formado en PBS, se centrifugó, se estimó el volumen celular formado y se adicionaron diez volúmenes de buffer de lisis celular con inhibidor de proteasas y DTT (es un agente reductor que evita la formación de puentes disulfuro entre cisteínas) a las células. Se separó la fracción citoplasmática de la nuclear centrifugando 500 x g durante 7 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante (fracción citoplasmática) a un nuevo tubo, colocamos el botón formado en hielo, se eliminó el remanente de proteína citoplasmática mediante centrifugación a 20 000 x g durante 15 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Para el lavado de núcleos se adicionaron 500 µL de buffer de lavado nuclear con inhibidor de proteasas y DTT, el botón nuclear se disolvió con un agitador y se colocó en hielo durante dos minutos, se centrifugó a 500 x g durante siete minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 150 µL de buffer de almacén de núcleos y se pipeteó para eliminar aglomerados nucleares. Para la lisis de núcleos se adicionaron diez volúmenes de agente de lisis nuclear por cada volumen formado a la suspensión nuclear, se limpió el lisado nuclear por centrifugación a 20 000 x g durante cinco minutos a 4°C, el sobrenadante (extracto de proteínas nucleares) se transfirió a un nuevo tubo y se cuantificó.

#### **IV.V. Extracción de proteínas totales de células A549**

Se adicionó buffer de lisis (Véase apéndice, Tabla 2) a 0°C, se lavó la monocapa dos veces con PBS frío, se descartó el PBS por aspiración, se añadió buffer de lisis (1 mL) por cada área de 25 cm<sup>2</sup>. Se incubó en hielo durante 20 minutos, se acumularon las células con un scraper en un lado de la caja, se transfirieron las células a un tubo y se centrifugaron a 9500 rpm por dos minutos a 4°C, se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo (proteínas totales) y se cuantificó su concentración mediante el método de *Bradford*.

#### **IV.VI. Cuantificación de proteína**

La proteína obtenida se cuantificó mediante método de Bradford, cuyo fundamento se basa en la tinción de residuos de aminoácidos básicos y aromáticos especialmente arginina, con una solución de azul de *Coomassie*.

A partir de una curva patrón hecha a base de albúmina y en placas de ELISA se cuantificó la cantidad de proteína contenida en cada muestra obtenida de la extracción citoplasmática y nuclear.

Para el diseño de la curva patrón se colocaron concentraciones ascendentes de albúmina partir de una solución de 1 mg/mL, se hicieron seis concentraciones diferentes por duplicado obteniendo 2, 4, 6, 8, 10 µg/µL respectivamente y cada dilución se aforó a 10 µL más 200 µL de azul de *Coomassie*. Para la lectura de las muestras citoplasmáticas se hizo una dilución 1:4 añadiendo 5 µL y para las proteínas nucleares se agregaron 10 µL, con el objetivo de tener una densidad óptica detectable de proteína y poder interpolar su concentración en la curva patrón, ya que en citoplasma se encuentra una gran concentración de proteínas a diferencia de aquellas extraídas de núcleo. Se graficaron las absorbancias obtenidas a partir de la ecuación de la recta  $y=mx+b$ . Las absorbancias de las muestras se interpolaron en la recta para determinar su concentración, de la proteína nuclear se ubicaron 0.915 µg/µL. Debido a que su concentración es baja y las proteínas se encuentra en un volumen muy grande, las muestras se concentraron durante 10 minutos con ayuda de una liofilizadora (Thermo Savant, USA), una vez obtenido un volumen menor se determinó la cantidad de volumen necesario para hacer ensayo de Western Blot del cual se necesitan 20 µg de proteína por muestra a analizar.

#### IV.VII. Western Blot

Con la finalidad de detectar a MMP-28 ya sea en citoplasma, núcleo ó medio extracelular, se montó el ensayo de Western Blot cuyo fundamento es detectar de manera específica a Epilisina a partir de la asociación antígeno-anticuerpo.

Para ello se corrieron en un gel (compuesto por dos fases, gel concentrador al 4% y gel separador al 12%, véase apéndice tabla 3 y 4) mediante electroforesis SDS-PAGE, 10 µL de marcador de pesos moleculares, 20 µg de las muestras citoplasmática, nuclear y medio celular por duplicado así como proteínas totales, además de agregar una muestra adicional la cual es un lisado celular (Abnova, Walnut CA USA) que sobreexpresa de manera transitoria MMP-28 proveniente de la línea celular 293T, la cual se deriva de la línea celular 293 proveniente de riñón humano en estado embrionario con la cualidad adicional de tener insertado el gen para el antígeno T-SV40 y ser sensible a la temperatura. La banda reportada para el lisado celular posee un peso de 43.23 kDa<sup>34</sup> correspondiente a MMP-28.

Las muestras proteicas una vez cuantificadas, concentradas y aforadas a 10 µL se mezclan con 10 µL de buffer muestra (Vease apéndice, tabla 5), se calientan las muestras a 68°, se colocan cinco segundos en hielo y se inyectan inmediatamente en el gel, que está previamente montado en una cámara de electroforesis (Bio-Rad CA EUA).

Como medio de difusión de corriente para la migración de las proteínas en el gel se usó buffer de corrida (Véase apéndice, tabla 6).

Una vez obtenidas las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana con la capacidad de contener las proteínas, para ello se prehumedeció una membrana PVDF en metanol absoluto durante cinco segundos y se enjuagó con agua destilada por cinco minutos. Para eliminar sales del buffer de corrida e incrementar la absorción de proteínas en la membrana, se equilibraron la membrana y el gel sumergiéndolas en buffer de transferencia durante diez minutos. Después se realizó la transferencia con ayuda de una cámara semi-húmeda (Bio-Rad Hercules CA) donde se colocaron por superposición cuatro componentes: una hoja de papel filtro previamente humedecida en buffer de transferencia, la membrana PVDF, el gel que corrió en electroforesis y otra hoja de papel filtro prehumedecida en buffer de transferencia, las muestras corrieron a 15 Volts durante 18 minutos.

Una vez realizada la transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana PVDF, se revisó la eficiencia de ésta a partir de la inmersión de los geles en azul de *Coomasie*, el cual se encarga de teñir las proteínas presentes en el gel.

Para evitar la detección de productos inespecíficos se dejó bloqueando la membrana con leche descremada al 5% en buffer TBS-T (Tris, NaCl y Tween al 0.05 %) durante dos horas a temperatura ambiente en agitación constante. Después se incubó toda la noche cada membrana a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios:

Anti MMP-28 policlonal obtenido de conejo (Triple Point Biologics, OR USA) detecta diversos dominios exclusivos de MMP-28 (1 µg/mL).

Anti p53 monoclonal obtenido de ratón (Millipore, Billerica MA); el cual detecta la secuencia de aminoácidos 306-393 de la región carboxilo terminal, indicador de la pureza de la fracción nuclear (dilución: 1:200). El gen p53 es llamado así por la masa molecular del producto proteico con 393 aminoácidos. Es regulador del ciclo celular, involucrado en apoptosis y en la manutención de la estabilidad genética, por lo que esta proteína tiene una ubicación exclusiva en el núcleo <sup>31</sup>.

Anti β-tubulina (Santa Cruz, CA EUA) (0.4 µg/mL). La tubulina es el mayor componente del citoesqueleto, posee cinco variantes (α, β, γ, δ y ε), a su vez β-tubulina tiene siete isoformas (β1, β2, β3, β4, β5, β6 y β8) se han caracterizado y expresado en tejido de mamífero. Las isoformas β1 y β4 se encuentran en el citosol, β2 se encuentra en el núcleo y en el nucleoplasma, y β3 es una proteína específica del citoesqueleto de neuronas. La proteína tiene un peso aproximado de 50 kDa, este peso puede variar de acuerdo a la isoforma <sup>32</sup>.

Cada anticuerpo se diluyó con albúmina al 0.1% en Buffer TBS-T. Se lavaron las membranas tres veces en buffer TBS-T durante 15 minutos cada uno. Se incubó con anticuerpo secundario biotinilado (Biogenex, San Ramon CA) durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Se lavó tres veces más con TBS-T, durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se amplificó la señal al incubar una hora con estreptavidina marcada con HRP (Horseradish Peroxidase) la cual es una peroxidasa extraída de rábano, cuyo fin es catalizar una reacción en la que el luminol se oxida y entra en un estado de excitación produciendo una emisión de luz. Se lavó tres veces con TBS-T durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la reacción de quimioluminiscencia donde se mezcló luminol con un buffer de peróxido de hidrógeno y peróxido (Chemicon , Temecula CA) el cual se incubó durante tres minutos, pasado este tiempo las muestras se revelaron con ayuda de una cámara de detección de quimioluminiscencia (Bio-Rad Chemidoc, EUA).

## V. Resultados

### V.I. PCR en Tiempo Real

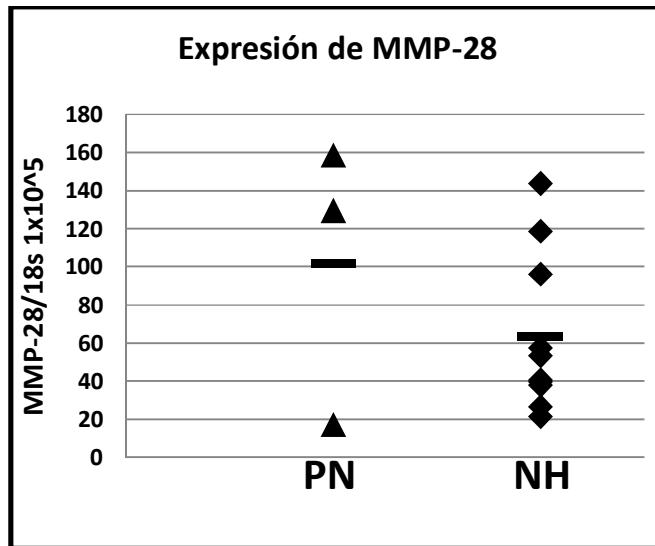
Se realizaron cuatro repeticiones del análisis de PCR en tiempo real, para determinar el nivel de expresión de MMP-28 y 18s, las muestras y la curva patrón se montaron por triplicado. Los datos obtenidos no mostraron una diferencia significativa en el nivel de expresión entre cDNA de tejido normal y de Neumonitis por Hipersensibilidad (Figura 4), estos resultados se analizaron estadísticamente con ayuda de una prueba de Tukey con una  $p=0.263$

**Tabla 10. Nivel de expresión de MMP-28 en tejido sano de pulmón (PN) y NH ajustado con base al número de copias obtenido para el gen constitutivo 18s.**

Muestra	MMP 28/18s $1 \times 10^5$
PN	17.314
PN	158.617
PN	129.578
NH	96.136
NH	143.689
NH	26.762
NH	118.657
NH	39.779
NH	21.506
NH	37.992
NH	57.587
NH	40.772
NH	53.402

**Tabla 11. Promedio y desviación estándar obtenido de los datos de qPCR de acuerdo al número de copias obtenido del cDNA de tejido normal y con NH**

Muestra	Media	Desviación Estándar
PN	101.836333	74.62
NH	61.129	41.52



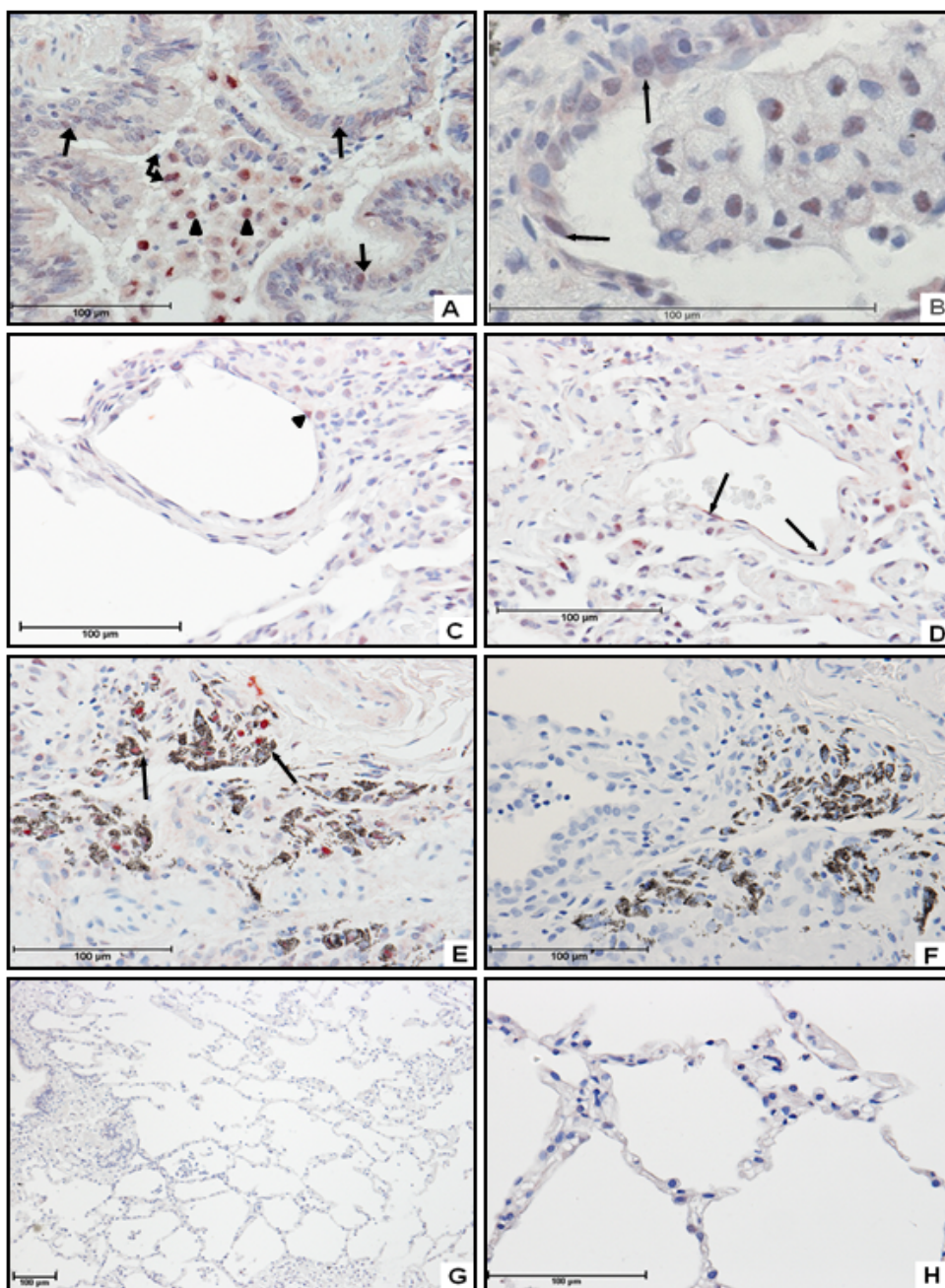
**Figura 4. Nivel de expresión de MMP-28.** Datos obtenidos de qPCR para determinar nivel de expresión de MMP-28 en tejido normal y de Neumonitis por Hipersensibilidad normalizado con base al gen 18s (véase barra obscura que representa la media).

Los resultados obtenidos y las nuevas incógnitas formuladas a partir del análisis de expresión de MMP-28 en tejido de pulmón normal y de NH en el ensayo de qPCR, nos condujeron a analizar el tipo celular que expresa MMP-28 en laminillas de tejido pulmonar normal y de NH.

## V.II. Inmunohistoquímica

Las muestras de tejidos embebidos en parafina proveniente de pulmón de diez pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad expuestos al anticuerpo para MMP-28 reflejaron tinción positiva de una manera regionalizada y específica como se muestra en la figura 5A-D a destacar: en núcleos de células del epitelio bronquiolar (Figura 5A, 5B) y del epitelio alveolar en neumocitos tipo II (Figura 5C) así como del endotelio (Figura 5D), células inflamatorias infiltradas en el espacio alveolar como lo son macrófagos, agregados de éstos llamados células gigantes de cuerpo extraño (Fig. 5A). Llama la atención que las células teñidas de manera positiva para el anticuerpo contra MMP-28 tienen un patrón de tinción similar, el cual es dado en el núcleo, siendo además un patrón generalizado con respecto a las demás laminillas de tejido con NH. Se tiñe el núcleo de un gran número de células inflamatorias, donde se encuentran macrófagos y sin apreciar la presencia de neutrófilos, basófilos ó eosinófilos.

Es importante resaltar que los cuatro tejidos normales de pulmón al ser expuestos con el anticuerpo para MMP-28 con la misma concentración que los casos con NH (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reflejaron de manera interesante una tinción negativa (Fig. 5G, 5H), como lo observado en el control negativo (Fig. 5F) que no lleva anticuerpo.



**Figura 5. Inmunohistoquímica para detección de MMP-28.** Tejido pulmonar con Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) A-F, y tejido pulmonar normal G y H. **A)** Tinción positiva en núcleos de células de epitelio bronquiolar, caracterizado por ser pseudoestratificado cilíndrico ciliado (flechas), así como en núcleos de células inflamatorias infiltradas en el espacio bronquiolar, algunos macrófagos formando células gigantes de cuerpo extraño (flecha dual) y macrófagos individuales (cabezas de flecha), aumento **40x**. **B)** Tinción positiva para núcleos de epitelio bronquiolar (flechas) aumento en **100x**. **C)** Tinción positiva en núcleos de células epiteliales alveolares, a destacar: núcleos de Neumocitos Tipo II (punta de flecha) aumento **40x**. **D)** Tinción positiva en núcleos de endotelio venoso (flechas), caracterizado por contener en el lumen algunos eritrocitos y poseer una pared laxa, así como algunos macrófagos introducidos en el intersticio alveolar, aumento **40x**. **E)** Tinción positiva para células inflamatorias en acción, al engullir partículas antigénicas de carbón en el intersticio bronquiolar (flechas) aumento **40x**. **F)** Control negativo (compárese con el mismo corte de tejido (imagen E) donde se ven células con tinción positiva), aumento **40x**. **G y H)** Tejido normal de pulmón expuesto con anticuerpo para MMP-28 el cual no demostró tinción positiva, aumento **10x** y **40x** respectivamente.



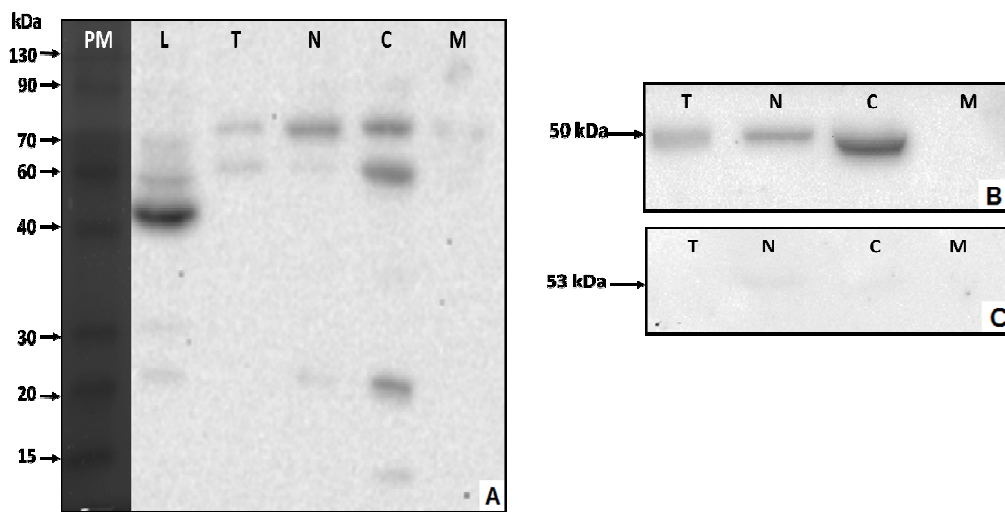
El patrón de tinción característico dado por el anticuerpo MMP-28 en las laminillas de tejido con NH nos condujo a comprobar que MMP-28 se expresa en núcleos de células pulmonares epiteliales, ya que en un análisis previo hecho por nuestro grupo de investigación, se detectó la expresión de MMP-28 de manera nuclear de acuerdo a análisis inmunohistoquímico en tejido pulmonar con FPI e inmunocitoquímico hecho en células de neumocitos tipo II A549<sup>33</sup>.

Para tener mayor consistencia de acuerdo a los resultados obtenidos en inmunohistoquímica y la localización nuclear de epilisina en epitelios de tejido pulmonar con NH, se llevó a cabo un análisis de ubicación proteica con ayuda de un anticuerpo de otra compañía (Triple Point Biologics, OR USA) a partir de la técnica de *Western Blot*, también llamado Inmunoblot ya que es un ensayo de detección de proteínas en este caso MMP-28, fundamentado en el principio de afinidad antígeno-anticuerpo, hecho con células A549 de las cuales se aisló la región citoplasmática, la región nuclear, y se extrajeron proteínas totales.

### V.III. Western Blot

Para el montaje de este ensayo se usaron anticuerpos para comprobar la pureza de las regiones citoplasmática y nuclear aisladas, con el objetivo de identificar la localización de epilisina en estas fracciones así como en proteínas totales y medio celular provenientes de las células de adenocarcinoma de pulmón de neumocitos tipo II de la línea celular A549.

Se usó un anticuerpo policlonal obtenido de conejo (Triple Point Biologics, OR USA) contra epilisina, que detecta diversos dominios únicamente de la enzima en cuestión (Fig. 7A) y con el cual obtuvimos los siguientes resultados:



**Figura 7. Western Blot de diversas fracciones celulares provenientes de células A549 para detección de MMP-28 con anticuerpo policlonal TPB.** Por orden de aparición, (PM) Marcador de pesos moleculares (L) Lisado celular que sobreexpresa epilisina de manera transitoria (incluido únicamente en la figura A), (T) Proteínas totales, (N) Proteínas nucleares, (C) Proteínas citoplasmáticas, (M) Proteínas aisladas del medio celular.

La muestra de lisado demostró cinco bandas con un peso aproximado de 25, 32, 43, 58 y 70 kDa respectivamente. La banda aproximada a 40 kDa se encuentra muy bien detectada por el anticuerpo y corresponde al peso aproximado para epilisina en la línea celular 293T (43.23 kDa)<sup>34</sup>.

La muestra de proteínas totales posee dos bandas correspondientes a 60 y 75 kDa aproximadamente, similares a las que aparecen en la fracción citoplasmática y nuclear.

En la fracción nuclear se detectaron tres bandas, una banda poco perceptible con un peso aproximado de 25 kDa correspondiente al dominio carboxilo terminal ya que se ha reportado que esta región tiene un peso de 26.7 kDa<sup>14</sup>, también se detecta una banda con peso

aproximado a 60 kDa y una banda más de aproximadamente 75 kDa; la banda de 60 kDa podría representar a la forma inactiva de epilisina y las de mayor tamaño molecular podrían representar a epilisina glucosilada.

Con respecto a la fracción citoplasmáticas se pueden detectar cinco bandas las cuales corresponden a un peso aproximado de 13 kDa, 25 kDa (misma banda detectada en la región nuclear), 60 kDa, 75 kDa similar a la banda ubicada en la fracción nuclear, así como una banda apenas detectable de 90 kDa.

En el medio celular no se detectó proteína alguna, cabe señalar que el ensayo se hizo por duplicado donde se puede apreciar con mayor detalle la ausencia de proteína en esta región, (datos no mostrados).

Se usó anti  $\beta$ -tubulina con el objetivo de comprobar que se aislaron de manera adecuada las fracciones citoplasmática y nuclear. Anti  $\beta$ -tubulina es un anticuerpo policlonal que detecta la secuencia de aminoácidos 210-444 de  $\beta$ -tubulina de origen humano, la banda detectada se encuentra en un rango de 43 a 55 kDa (Figura 7B), detectada en la región de proteínas totales, la región nuclear y citoplasmática.

Para definir la región citoplasmática de la nuclear se usó anti-p53 monoclonal obtenido de ratón (Millipore, Billerica MA), (Figura 7C).

La proteína nuclear posee una banda correspondiente al peso aproximado para p53. La región citoplasmática no posee banda para el peso correspondiente a p53. El carril que contiene la fracción que proteína total no tiene marca para p53, así como también no se detectó proteína alguna en el medio celular (Figura 7C).

## VI. Discusión

Los resultados obtenidos en los experimentos desarrollados en este trabajo reflejan la ubicación y nivel de expresión de epilisina en tejido normal y de Neumonitis por Hipersensibilidad. El análisis de PCR en tiempo real indica que los pulmones normales y de NH no muestran una diferencia significativa en cuanto al nivel de expresión de epilisina, comprobado con una prueba estadística de Tukey la cual indica una  $p= 0.263$ , una de las limitantes de este estudio es el número de muestras normales tan reducido comparado con el número de muestras con NH lo cual nos lleva a tener un análisis poco robusto. Un ensayo tan fino como lo es el qPCR necesita un número de muestras mucho mayor que el que utilizamos en este análisis. Las implicaciones que conlleva obtener tejidos pulmonares normales lo hace una tarea complicada. A pesar de ello estas muestras fueron proporcionadas por el INER, un instituto especializado en patologías pulmonares con el objetivo de profundizar más sobre los mecanismos moleculares de la NH.

Aún con esta dificultad, el análisis inmunohistoquímico reflejó diferencias entre tejido pulmonar normal y tejido con NH en cuanto a la ubicación de epilisina sintetizada, expresándose epilisina de manera muy clara en muchos núcleos de epitelio bronquiolar, núcleos de células endoteliales y con menor frecuencia en núcleos de neumocitos tipo II de epitelio alveolar (Figura 5C) donde es interesante mencionar que de acuerdo a un análisis previo de inmunohistoquímica en epitelios pulmonares con FPI desarrollado por nuestro grupo de investigación, la ubicación de epilisina es abundante en núcleos de epitelio alveolar<sup>33</sup>, en contraste con la NH donde su expresión es característica en núcleos de epitelio bronquiolar.

De acuerdo a la literatura se sabe que al instilar con *Pseudomonas aureginosa* al ratón deficiente de epilisina, éste tiene un reclutamiento temprano de macrófagos con un menor número de neutrófilos hacia el sitio de infección<sup>10</sup>, concluyendo que epilisina puede actuar como un regulador quimiotáctico negativo de macrófagos, ello nos llevaría a inferir que epilisina es expresada por los epitelios, así como también por parte del endotelio con el objetivo de que los alveólos puedan sobreponerse de manera gradual a la invasión de determinado agente biológico, ya que al desencadenar una respuesta inmune el hacinamiento de macrófagos en el espacio alveolar podría evitar el adecuado intercambio gaseoso.

Hay un gran número de células inflamatorias característico de NH, en el que se encuentran de manera prioritaria macrófagos con cierta ausencia de polimorfonucleares. De acuerdo a Manicone<sup>10</sup> los ratones deficientes de epilisina tienen un reclutamiento más rápido de

macrófagos hacia los alveólos, eliminando el antígeno de una manera más eficiente, sin necesidad de reclutar gran cantidad de neutrófilos, y donde las quimiocinas necesarias para el reclutamiento de neutrófilos por parte de macrófagos (MIP-2 y KC) se encuentran en niveles muy bajos en el pulmón y en lavados bronquioalveolares, todo esto comparado con pulmones normales, indicando que MMP-28 podría estar implicado en la expresión de estas quimiocinas.

También se sabe que hay un equilibrio entre el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos al sitio de infección, ya que son los encargados de eliminar el agente generador de estrés dentro del pulmón, actuando ya de manera secundaria neutrófilos que también tienen la capacidad de engullir partículas y degradarlas <sup>10</sup>.

En los tejidos con NH (véase figura 5E) algunos macrófagos reflejan tinción positiva nuclear para MMP-28 al engullir partículas antigénicas tales como carbón, ello nos estaría indicando que probablemente MMP-28 se expresa en núcleo de macrófagos ante cierto estrés como lo puede ser la exposición ante cualquier agente externo, característico de NH. El análisis indica que no todos los macrófagos expresan MMP-28, resultado consistente de acuerdo a lo que la bibliografía dice, donde únicamente macrófagos provenientes de médula ósea expresan MMP-28 a diferencia de los macrófagos alveolares que no la expresan <sup>10</sup>.

De manera interesante el tejido normal de pulmón a partir de la técnica de inmunohistoquímica se observó una tinción negativa para epilisina aun siendo un resultado contrario a lo esperado, ya que la literatura nos sugiere que epilisina se expresa en pulmón normal<sup>15</sup> el qPCR nos confirma esta aseveración en cambio en el tejido no se ve reflejada expresión alguna de la proteína, probablemente se deba al grado mínimo de expresión de la proteína ya que para poder detectar a epilisina en condiciones normales es necesario aumentar la concentración de anticuerpo para que pueda ser detectado, esto nos hace inferir que el análisis de qPCR donde no hay diferencias significativas entre nivel de expresión de epilisina entre pulmón normal y de NH deberá ser corroborado.

De acuerdo al ensayo de Western Blot para MMP-28 hecho con proteínas totales y fracciones proteicas aisladas de núcleo, citoplasma y medio de células A549, adicionando una muestra de lisado celular de la línea 293T que sobreexpresa de manera transitoria epilisina determinamos que epilisina es una proteína que se localiza en núcleo de manera inactiva (58 kDa) y probablemente glucosilada (75 kDa) confiriéndole un peso mayor al reportado. En el citoplasma se encuentra la forma de 75 kDa y la de 60 kDa, aunque se puede detectar la banda correspondiente a la región carboxilo terminal (26.7 kDa). También se localizó una banda más ligera de 13 kDa no reportada para alguno de los prodominios de epilisina. Con respecto a la fracción del medio celular analizada con epilisina, de manera interesante podemos establecer

en la región nuclear de manera prioritaria y correlaciona con la unión a Annexina V y el corte de PARP, sugiriendo una nueva función de MMP-2 en la degradación de matriz nuclear en apoptosis endotelial inducida por los fumadores<sup>36</sup>.

La mayoría de los sustratos de las MMP's son moléculas que van más allá que sólo componentes de matriz, por lo tanto es razonable proponer que las MMP's no sólo funcionan únicamente como degradadoras, sino que puede llegar a modificar la expresión génica y que los datos sugieren que epilisina podría tener un papel relevante en procesos de regulación en el pulmón.

## VII. Conclusiones

El análisis de expresión de epilisina mediante la técnica de qPCR no mostró diferencias significativas entre tejido normal de pulmón y de tejido pulmonar proveniente de pacientes con NH.

El análisis de inmunohistoquímica reflejó una tinción positiva para epilisina en tejidos con NH, en núcleos de epitelio alveolar, epitelial y endotelial. Así como también demostró una tinción negativa para epilisina en tejidos normales de pulmón.

El análisis de Western Blot reflejó la presencia de epilisina de manera inactiva en el núcleo de células A549 de adenocarcinoma de pulmón de neumocitos tipo II.

## **VIII. Perspectivas**

Los objetivos desarrollados en este trabajo nos dejan con nuevas incógnitas para promover la investigación de esta metaloproteinasa, ya que debido a su descubrimiento relativamente reciente se sabe muy poco de ella, por lo tanto, la probable localización nuclear durante condiciones patológicas, los sustratos nucleares, el transporte y tráfico de epilisina (incluyendo la activación local y pasos de inhibición) serán las nuevas rutas para identificar y entender la función que pueda cumplir.



## IX. Apéndice

### Elaboración de cDNA

Tabla 1. Mezcla de reacción para amplificación de cDNA.

Mezcla de reacción	1x (µL)	8x (µL)
Buffer de reacción 5x 1x(50mM Tris-HCl,pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub> )	4.0	32.0
dNTP's 0.5 mM (dATP, dGTP,dCTP,dTTP)	1.0	8.0
Inhibidor de RNAsas	0.5	4.0
Transcriptasa reversa (MMLV)	1.0	8.0

### Aislamiento de producto de PCR para MMP-28 y 18s

Para purificar el DNA del gel se utilizaron dos tipos de columnas de separación (Princeton Separations NJ) (Millipore Billerica MA).

Separación a partir de columnas Princeton Separations:

Se usaron cuatro columnas dos de ellas contenían los amplicones obtenidos del PCR para MMP-28 ó Epilisina y dos de ellas fueron usadas para los amplicones obtenidos de 18s.

Hidratación de la columna: Tapamos las columnas perfectamente con la solución separadora liofilizada, removimos la tapa de cada columna y se reconstituyeron adicionando 800 µL de H<sub>2</sub>O dde. Se taparon las columnas y se hidrataron las soluciones formando un gel invirtiendo la columna. Se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarlas. Se removieron las burbujas de aire invirtiendo y tapando muy bien, permitiendo que el gel fluyera a la parte opuesta de la columna. Manteniendo la columna erguida para mantener el gel en el rack del microtubo.

Se removieron la tapa superior e inferior. Permitimos que el exceso de fluido de las columnas drenaran por gravedad en el tubo de lavado (2 mL).Se descartó este fluido. Se sacudieron las columnas y se lavó cada tubo en una velocidad variable a 750 g por dos minutos para remover el fluido intersticial. Aproximadamente 300 µL del fluido fue removido.

que epilisina no es una metaloproteinasa que se secrete al medio en la línea celular A549 ya que la fracción de medio (Figura 7BM) no posee banda alguna para epilisina, aunque cabe mencionar que probablemente se secrete ante cierto estímulo, probablemente algún factor de crecimiento o alguna situación de estrés, ya que se sabe que su expresión es dada en condiciones basales en algunos órganos entre ellos el pulmón pero que también se sobreexpresa en condiciones posteriores a daño celular como en procesos de cicatrización <sup>12</sup>.

Con los datos recabados no podemos asegurar de manera categórica que epilisina se encuentre en núcleo ya que la fracción nuclear puede tener cierta contaminación citoplasmática reflejado en el ensayo de Western Blot hecho para detectar  $\beta$ -tubulina, donde se ve la presencia de una banda dentro del rango de los 43 a 55 kDa tanto en la región citoplasmática como en la región nuclear. Sin embargo, el peso de la banda para la región nuclear y para la región citoplasmática tiene cierta diferencia en peso (Figura 8) llevándonos a pensar que probablemente en la región nuclear este presente la isoforma  $\beta 2$  de  $\beta$ -tubulina, descrita en núcleo <sup>35</sup>.

El ensayo de Western Blot hecho para detectar a p53 que es una proteína que se encuentra exclusivamente en núcleo, fue detectado únicamente en núcleo.

Anteriormente se creía que la detección de metaloproteinasas en núcleo era un resultado equívoco y en cierto momento rechazado, ahora se sabe que las metaloproteinasas más allá de tener una función degradativa pueden participar en eventos patológicos y fisiológicos, actuando como proteinasas de manera constitutiva, regulatorias e inducibles <sup>36</sup>.

Diversas clases de MMP's (incluyendo MMP-2,-3,-9,-11,-13 y MT1-MMP/MMP-14) han sido identificadas y caracterizadas en núcleo de diversos tipos celulares de tejidos humanos y en modelos animales. Sin embargo el mecanismo de translocación nuclear de diferentes MMP's es por lo general pobremente caracterizado <sup>36</sup>.

En cuanto al análisis de localización nuclear de otras metaloproteinasas, en pulmón se ha caracterizado la localización de MMP-2 en núcleos de células pulmonares endoteliales arteriales de fumadores. Es bien conocido que en los fumadores se induce la activación de proteasas así como de MMP's que contribuyen a la destrucción de los alveólos pulmonares debido a la muerte celular. Se ha encontrado que en los fumadores se induce apoptosis, caracterizada por un aumento de unión a anexina V y corte de PARP mejor correlacionado con actividad de gelatinasa incrementada, revelando que los niveles de pro-MMP-2 y MMP-2 activa se incrementaron en las fracciones citosólica y nuclear aisladas de células endoteliales de arterias pulmonares de fumadores. En particular, estas observaciones fundamentan que MMP-2 contribuye a la actividad de gelatinasa inducida por los fumadores, la cual se localiza

Se descartó el tubo de lavado y el fluido intersticial. Para procesar las muestras se transfirieron aproximadamente 20  $\mu\text{L}$  de la reacción de PCR. Se colocaron las columnas en el tubo colector y se colocaron ambos en el rotor manteniendo la orientación apropiada, se centrifugaron a 750 g por dos minutos y se descartaron las columnas. Se cuantificaron las muestras con ayuda de un espectrofotómetro (Nano Drop 2000 Thermo Fisher Scientific US).

## Curva patrón para PCR en tiempo real

Para poder cuantificar el número de copias presentes en nuestras muestras problema fue necesario obtener una curva de referencia que nos indique el número de copias conocida a partir de diluciones con un número de copias definido.

Para obtener estos datos se toma en cuenta lo siguiente:

### Ecuación 1.0

$$(\text{No. de pb del amplicón}) \left( \text{Peso promedio de un pb } 662 \frac{\text{Da}}{\text{pb}} \right) = \text{Dalton} = \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

A partir del dato obtenido en la ecuación 1.0 se sustituye en la ecuación 2.0:

### Ecuación 2.0

$$\frac{\text{g/mol}}{\text{No. de Avogadro } 6.022 \times 10^{23} \text{ copias/mol}} = \frac{\text{Copias}}{\text{mol}} = \text{g/copia}$$

Se sustituye 2.0 en ecuación 3.0:

### Ecuación 3.0

$$\frac{\text{Concentración dada en el espectrofotómetro } \left[ \frac{\text{g}}{\mu\text{L}} \right]}{\text{g/copia}} = \text{copias}/\mu\text{L}$$

Una vez obtenido el número de copias por microlitro podremos calcular el volumen necesario para tener  $1 \times 10^{10}$  copias de la siguiente forma:

**Ecuación 4.0**

$$C1V1 = C2V2$$

Despejando  $V_2$  de la ecuación 4.0 se obtiene la siguiente ecuación:

**Ecuación 4.1**

$$V2 = \frac{C1V1}{C2}$$

Con la ecuación 4.1 determinaremos los microlitros necesarios que contendrán  $1 \times 10^{10}$  copias de la proteína deseada.

Considerando el tubo 1 con mejor absorbancia de 1.67 para 18s de 14 ng/ $\mu$ L y que el amplicón mide 187 pb para 18s, sustituimos:

$$(187 \text{ pb}) \left( 662 \frac{\text{Da}}{\text{pb}} \right) = 123794 \text{ Da} = \text{g/mol}$$

$$\frac{123794 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{6.022 \times 10^{23} \text{ copias/mol}} = 2.05560 \times 10^{-19} \text{ g/copia}$$

Concentración de cDNA=14 ng/ $\mu$ L=1.4x10<sup>-8</sup> g/ $\mu$ L

$$\frac{(1.4 \times 10^{-8} \text{ g}/\mu\text{L})}{(2.056 \times 10^{-19} \text{ g/copia})} = 6.8 \times 10^{10} \text{ copias}/\mu\text{L}$$

Tenemos que:

$$V_2 = C_1 V_1 / C_2$$

Sustituyendo:

$$V2 = \frac{\left(1 \times 10^{10} \frac{\text{copias}}{\mu\text{L}}\right) (100 \mu\text{L})}{\frac{6.8 \times 10^{10} \text{ copias}}{\mu\text{L}}} = 14.7 \mu\text{L}$$

Esto se afora a 100  $\mu\text{L}$  con 85.3  $\mu\text{L}$  de agua DEPC

A partir de esta solución se pueden hacer diluciones seriales para obtener  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  copias en cada volumen de 100  $\mu\text{L}$ , tomando 10  $\mu\text{L}$  de la solución inicial y aforando a 100  $\mu\text{L}$  con 90  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, y así sucesivamente hasta obtener las 10 diluciones.

Para obtener la curva de MMP-28 se tomó en cuenta la concentración con absorbancia de 1.74 la cual contenía 21.7 ng/ $\mu\text{L}$  y se calculó de la siguiente manera:

$$(117 \text{ pb}) \left( \frac{662 \text{ Da}}{\text{pb}} \right) = 77454 \text{ Da} = \text{g/mol}$$

$$\frac{77454 \text{ g/mol}}{6.022 \times 10^{23} \text{ copias/mol}} = 1.286183992 \times 10^{-19} \text{ g/copia}$$

Cuantificación de cDNA 21.7 ng/ $\mu\text{L}$  =  $2.17 \times 10^{-8}$  g/ $\mu\text{L}$

$$\frac{(2.17 \times 10^{-8} \text{ g}/\mu\text{L})}{1.286183992 \times 10^{11} \text{ g/copia}} = 1.687161412 \times 10^{11} \text{ copias}/\mu\text{L}$$

Tenemos que:

$$V2 = \frac{C1V1}{C2}$$

Sustituyendo:

$$V_2 = \frac{1 \times 10^{10} \text{ copias}/\mu\text{L})(100 \mu\text{L})}{1.7 \times 10^{11} \text{ copias}/\mu\text{L}}$$
$$= 5.9 \mu\text{L} + 94.1 \mu\text{L de agua DEPC}$$

## Extracción de proteínas totales

Tabla 2. Componentes de Buffer de Lisis

Reactivo
Tris 50 mM pH=7.5
EDTA 10 mM
NaCl 150 mM
NP-40 al 0.5%
Desoxicolato de Sodio al 0.25%
PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0.1 $\mu\text{M}$

## Western Blot

Reactivos necesarios para formación del gel de poliacrilamida usado en cámaras de electroforesis con dodecilsulfato (SDS-PAGE), gel concentrador al 4%, gel separador al 12%.

Tabla 3. Componentes de gel concentrador

Reactivos	Gel concentrador (4%)
Agua dde	2.9 mL
Tris HCl 1.5 M pH=6.8	1.2 mL
SDS 10%	100 $\mu\text{L}$
Acrilamida	664 $\mu\text{L}$
PSA 10%	50 $\mu\text{L}$
TEMED	10 $\mu\text{L}$

**Tabla 4. Componentes de gel separador**

Reactivos	Gel separador (12%)
Agua dde	3.3 mL
Tris HCl 1.5 M pH=8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida	3.9 mL
PSA 10%	50 µL
TEMED	10 µL

**Tabla 5. Componentes de Buffer muestra**

Reactivos	Volumen (mL)
Agua destilada	4.7
Tris-HCl 0.5 M pH=6.8	1.0
Glicerol	1.0
SDS 10% (w/v)	1.0
2-Mercaptoetanol al 5%	0.1
Azul de Bromofenol 0.05% (w/v)	0.2

**Tabla 6. Contenido de buffer de corrida 5x para gel de electroforesis**

Reactivo	Cantidad
Tris- Base	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
Agua cbp	1000 mL

## X. Referencias

1. Jiménez García Luis F, Merchant Larios H. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Prentice Hall. México. 853 pags.
2. **Rozario T., Douglas W. De Simone.** The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Dev Biol.** 2010. 341:126-140
3. Pardo A., Selman M., Kaminski N., Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. 2008. 40: 1141-115.
4. Hadler-Olsen Elin, Fadnes Bodil, Sylte Ingebrigt, Uhlin- Ansen Lars y Winberg Jan-Olof. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J.* 2010. 278:28-45.
5. Fanjul-Fernández M., Folgueras Alicia R., Cabrera S., López Otín C., Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. 2009.1: 3-19.
6. Lohi Jouko, Wilson L. C, Roby D. Jill, Parks William C. Epilysin, a novel Matrix Metalloproteinase (MMP-28) Expressed in testis and Keratinocytes and in Response to Injury. **J Biol Chem.** 2001.276: 10134-10144.
7. Illman Sara A, Lohi Jouko and Keski-Oja J. Epilysin (MMP-28)—structure, expression and potential Functions. **Exp Dermatol.** 2008. 17:897-907.
8. Junseo Oh, Rei Takahashi, Shunya Kondo, Akira Mizoguchi, Eijiro Adachi, Regina M. Sasahara, Sachiko Nishimura, Yukio Imamura, Hitoshi Kitayama, David B. Alexander, Chizuka Ide, Thomas P. Horan, Tsutomu Arakawa, Hisahito Yoshida, Shin-ichi Nishikawa, Yoshifumi Itoh, Motoharu Seiki, Shigeyoshi Itoharu, Chiaki Takahashi, Makoto Noda. The Membrane-Anchored MMP Inhibitor RECK is a Key Regulator of Extracellular Matrix Integrity and Angiogenesis. **Cell.** 2001.107:789–800.
9. Fujimoto N, Terlizzi J, Aho S, Brittingham R, Fertala A, Oyama N, McGrath JA, Uitto J. Extracellular matrix protein 1 inhibits the activity of matrix metalloproteinase 9 through high-affinity protein/protein interactions. **Exp Dermatol.** 2006. 15: 300–307.
10. Manicone Anne M, Birkland Timothy P., Lin Michelle, Betsuyaku Tomoko, Rooijen Nico Van, Lohi Jouko, Keski-Oja Jorma, Wang Ying, Skerrett Shawn J., Parks C. Williams. Epilysin (MMP-28) restrains early macrophage recruitment in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **J Immunol.** 2009. Vol 182: 3866-3876.
11. Pardo A., Selman Moisés. 2006. Matrix Metalloproteases in Aberrant Fibrotic Tissue Remodeling. **Proc Am Thorac Soc.** 3: 383-388.
12. Heiskanen Tuomas J., Illman Sara A., Lohi Jouko, Keski- Oja J. Epilysin (MMP-28) is deposited to the basolateral extracellular matrix of epithelial cells. **Matrix Biol.** 2009.28:74-83.
13. Illman S. A., K. Lehti, J. Keski-Oja, J. Lohi. 2006. Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. **J. Cell Sci.** 119: 3856-3865.



14. Rodgers Ursula R., Kevorkian Lara, SurrIDGE Allison K., Waters Jasmine G., Swingler Tracey E., Culley Kirsty, Illman Sara, Lohi Jouko, Parker Andrew E., Clark Ian M. Expression and Function of Matrix metalloproteinase (MMP)-28. **Matrix Biol.** 2009. 28:263-272.
15. Marchenko George N., Strongin Alex Y. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with a unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. **Gene.** 2001. Volumen 265. pp: 87-93.
16. Saarialho-Kere U, Kerkelä E., Jahkola T., Soumela S., Keski-Oja J., Lohi J. 2002. Epilysin (MMP-28 expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. **J Invest Dermatol** 119: 14-21.
17. Gruber H.E., Ingram J.A., Hoelscher G. L., Zinchenko N., Norton H.J., Hanley Jr. E.N. Matrix metalloproteinase 28, a novel matrix metalloproteinase, is constitutively expressed in human in intervertebral disc tissue and is present in matrix of more degenerated discs. **Arthritis Res Ther.** 2009. 11:184-191.
18. Ross Michael, Romrell Lynn J., Kaye Gordon I., 1997. *Histología Texto y Atlas a Color.* México. Editorial Panamericana. 817 pags. Pags. 528-545.
19. Chapela M. R., Selman Lama M. 1991. Fibrosis pulmonar intersticial difusa y Alveolitis alérgica extrínseca. Rico G, Montero P. *Inmunología Pulmonar Básica.* Trillas. México D.F. pp: 115-131.
20. Kumar Vinay, Abul K. Abbas, Nelson Fausto. 2005. *Patología estructural y funcional.* Elsevier. España. 1517 páginas.
21. Zacharisen MC, Fink JN. Hypersensitivity pneumonitis and related conditions in the work environment. **Immunol Allergy Clin North Am.** 2011. Vol.31. pp 769-786.
22. Chapela M. R., Selman Lama M. Alveolitis Alérgica extrínseca. **Gac Med Méx.** 1999. 135: 177-187.
23. Hirschmann JV, Pipavath SN, Godwin JD. Hypersensitivity pneumonitis: a historical, clinical, and radiologic review. *Radiographics.* 2009.29: 1921-1938.
24. Barrera L, Mendoza F, Zúñiga J, Estrada A, Zamora A, Melendro E, Ramírez R, Pardo A, Selman M. Functional Diversity of T- Cell Subpopulations in Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2007. 177: 44-55.
25. Chan AL, Juarez MM, Leslie KO, Ismail HA, Albertson TE. Bird Fancier's Lung: A State-of-the-Art Review. **Clin Rev Allergy Immunol.** 2011
26. Zúñiga J., Torres-García D., Jimenez L., Ramírez-Martínez G., Juárez-Nicolás F., Mujica F., Romero L. T., Acuña V., Cruz-Lagunas A., Ruíz-Saavedra D., Ramos C., Montaña M., Mendoza-Milla C., Vargas-Alarcón G., Pardo A., Selman M. 2010. PDCD1 gene polymorphisms in different Mexican ethnic groups and their role in the susceptibility to hypersensitivity pneumonitis. **Clin Biochem.** 43: 929-31.
27. Aquino-Galvez A, Camarena A, Montaña M, Juarez A, Zamora AC, González-Avila G, Checa M, Sandoval-López G, Vargas-Alarcon G, Granados J, Pardo A, Zúñiga J, Selman M. Transporter associated with antigen processing (TAP) 1 gene polymorphisms in patients with hypersensitivity pneumonitis. **Exp Mol Pathol.** 2008.84: 173-177.

28. Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura-Valdez L, Carrillo G, Estrada A, Mejía M, Selman M. Increase of Lung Neutrophils in Hypersensitivity Pneumonitis Is associated with Lung Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.**2000. 161: 1698-1704.
29. Dishop M. K. 2011. Paediatric interstitial lung disease: classification and definitions. **Paediatr Respir Rev.**12: 230-7.
30. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, 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.**15:188-98.
31. Bruce Alberts, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Walter Peter. 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Science. EUA. 1463 pags.
32. Santa Cruz Biotechnology. <http://datasheets.scbt.com/sc-9104.pdf>. 28 de Febrero de 2012.
33. Maldonado Bonilla Mariel Sofía (2011). Expresión de la metaloproteinasa de matriz 28 en fibrosis pulmonar idiopática.Tesis, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
34. Abnova. [http://www.abnova.com/products/products\\_detail.asp?Catalog\\_id=H00079148-T01](http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=H00079148-T01) Consultado en Marzo de 2012.
35. Akoumianaki Tonia, Kardassis Dimitris, Polioudaki Hara, Georgatos Spyros D., Theodoropoulos Panayotis A. 2009. Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells. **Journal of cell Science.** 122. 1111-1118.
36. Manello Ferdinando, Medda Virginia. Nuclear localization of Matrix Metalloproteinases. **Prog Histochem Cytochem** 2012.47:27-58.
37. ATCC: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/> . Fecha de Consulta: Marzo de 2012.