

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

8157
JOM
EOPIM

METABOLISMO DE COLAGENA EN FIBROSIS
PULMONAR IDIOPATICA.

1985
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

MARTHA MONTAÑO RAMIREZ

MEXICO, D.F.

1985



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Moisés Selman Lama:

A quién agradezco profunda-
mente su comprensión, orien-
tación y asesoría para la -
realización de esta tesis.

A los Miembros del Jurado.

A mis padres:

A quiénes amo profundamente.

A Carlos:

Con profundo amor por
su apoyo y comprensión.

INDICE

	Págs.
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	21
OBJETIVOS	21
PACIENTES Y METODO	22
RESULTADOS	31
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFIA	55

METABOLISMO DE COLAGENA EN FIBROSIS

PULMONAR IDIOPATICA

INTRODUCCION

En años recientes se ha renovado el interés por la fibrosis pulmonar intersticial difusa (FPID), esta enfermedad independientemente de su etiología se caracteriza por inflamación crónica de las porciones distales del parénquima pulmonar, desarreglo difuso y complejo de la colágena intersticial, con destrucción progresiva de la arquitectura alveolar. Se ha publicado una gran variedad de estudios en el hombre (1-9) desarrollándose simultáneamente numerosos modelos experimentales, usando diversos agentes, tales como oxígeno (10-11), bleomicina (12-16), paraquat (17-19), hidroxitolueno-butilado + oxígeno (20-21) y otros (22,23).

Los primeros en describir los rasgos clínicos y morfológicos de esta enfermedad fueron Hamman y Rich en 1935 (25) (ver tabla I). Desde entonces se ha reportado un número cada vez mayor de pacientes con (FPID) y la lista de agresores capaz de provocarla aumenta progresivamente (ver tabla II), Sin embargo, en alrededor del 40% de los casos estudiados se desconoce el agente causal y a -

total y la distensibilidad pulmonar.

Desde el punto de vista de la ventilación e intercambio gaseoso existe hipoxemia progresiva (81) que empeora con el ejercicio.

En términos bioquímicos la fibrosis pulmonar se caracteriza por un aumento en el contenido total de colágena (27,28), dado principalmente por un incremento de la tipo I, lo que hace que el tejido sea menos distensible y acepte menor volumen de aire.

En estudios realizados con respecto a la síntesis de esta proteína en pacientes con FPI no se han encontrado diferencias significativa en relación a los controles (24).

En cuanto a la degradación de colágena, se han realizado estudios en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, y se ha reportado un incremento de colagenasa activa en estos pacientes con FPI (32).

COLAGENA:

La colágena es la proteína estructural más abundante del tejido conjuntivo y representa alrededor del 30% de las proteínas corporales en peso seco, llegando a constituir en algunos tejidos más del 50% (33-34).

Aunque se consideró inicialmente una proteína única, en la actualidad se ha demostrado que existen colágenas genéticamente distintas y hasta la fecha se han caracte-

terizado por lo menos 10 tipos diferentes de colágenas (35-38) (ver tabla III).

Los diferentes tipos de colágena están constituídos por asociación de cadenas (denominadas según el tipo de colágena), siendo las moléculas combinaciones únicas de tres cadenas α , dando lugar a la formación de la triple hélice.

Estas cadenas α difieren entre sí tanto en su estructura primaria como en la proporción de residuos de aminoácidos, aunque todas tienen en común la fórmula general (gli - X-Y)_n .

En general la glicina constituye el 33% de los residuos de aminoácidos de cada cadena α , siendo su presencia crucial para la formación de la triple hélice, ya que su radical R es un átomo de hidrógeno, que cabe en el interior de la triple hélice.

Además, la triple hélice es estabilizada por la hidroxiprolina, que constituye alrededor del 10% de los residuos, los cuales se localizan preferencialmente en la posición Y.

En cada giro de la hélice α están comprometidos 3 - residuos de aminoácidos (39), lo que permite a la hidroxiprolina unirse mediante una molécula de agua a otra hidroxiprolina, permitiendo la estabilización de la triple hélice a la temperatura corporal (33).

La prolina ocupa aproximadamente otro 10% de los residuos totales y se encuentra en la posición X, siendo la suma de ambos iminoácidos alrededor de 20-25% de los residuos totales de aminoácidos en las cadenas α .

Otro componente importante de la molécula es la hidroxilisina la cual ocupa la posición Y, glucosilándose en ciertas regiones de la cadena, esta glucosilación es requerida para la interacción de las moléculas de colágena dentro de las fibras formadas por esta proteína, además es necesaria para la interacción con otras macromoléculas de la matriz extracelular tales como glucoproteínas (fibronectina) (33).

La hidroxilisina mediante reacciones específicas de desaminación oxidativa, da origen a uniones covalentes entre las moléculas de colágena por medio de reacciones de --condensación aldólica, formandose una base de schiff la que se rearregla dando origen a una unión covalente lisinanor--leucina.

COLAGENA EN LA ESTRUCTURA ALVEOLAR:

Los mayores componentes del tejido conjuntivo en --pulmón incluyen: colágena, elastina, proteoglicanos y otras glicoproteínas; de esta matriz de proteínas, la colágena es la más abundante, constituyendo el 6 a 20% del pulmón en peso seco.

La colágena tipo I, compuesta de 2 cadenas $\alpha_1(I)$ y una cadena $\alpha_2(I)$, es la más abundante en la estructura alveolar (40). Esta colágena está distribuída en el intersticio alveolar pero no está presente en membranas endoteliales o epiteliales.

La colágena tipo III comprende 3 cadenas polipeptídicas idénticas $\alpha_1(III)$ y al igual que la anterior es una colágena intersticial; en particular ésta corresponde a "reticulina" demostrable por microscopía de luz.

La colágena tipo IV constituye parte de la membrana basal epitelial o endotelial en el pulmón y está compuesta de 3 distintas cadenas polipeptídicas $\alpha_1(IV)$, $\alpha_2(IV)$, $\alpha_3(IV)$ pero la combinación que forma la molécula tipo IV no se conoce con precisión.

La colágena tipo V también está presente en la estructura alveolar pero su localización exacta es incierta. Algunos investigadores sugieren que sólo se encuentra en las membranas basales, aunque se ha descrito también en el intersticio (41,42). En general es considerada una proteína "pericelular" ya que forma una matriz superficial alrededor de células tales como las células del músculo liso.

Esta colágena tipo V esta compuesta de 3 cadenas $\alpha_1(V)$, $\alpha_2(V)$, $\alpha_3(V)$.

En la estructura alveolar humana la relación de colágena tipo I a tipo III es aproximadamente 3:1 (43).

La colágena tipo I y la tipo III comprenden el 90- a 95% del total de colágena y la tipo IV y V el porcentaje restante.

La contribución de cada tipo de colágena a la estructura y función del intersticio alveolar no está completamente aclarada.

La colágena tipo I en virtud de su resistencia a la tensión, abundante distribución y habilidad para formar fibras hasta de 200 nm de diámetro, probablemente desempeñe un papel dominante determinando la forma alveolar y su distensibilidad (40).

Además este tipo de colágena contribuye a la organización celular del intersticio sirviendo como sitio de adhesión para fibroblastos y algunas glicoproteínas de la matriz (41).

El papel de la colágena tipo III no es muy claro, pero también sirve como anclaje para la adhesión de células mediada por fibronectina.

La colágena tipo IV probablemente modula la estructura y propiedades mecánicas de las membranas basales (41). Aunque no se ha estudiado con células pulmonares, se sabe que la colágena tipo IV puede servir como sitio de adhesión para las células epiteliales, a través de laminina (otro constituyente de membrana basal),

El papel de la colágena tipo V en la estructura y -

función pulmonar no es conocido. Existen datos recientes -- que sugieren que puede desempeñar un papel en la fijación - de membranas basales, fundamentalmente en los límites del - estroma (42).

BIOSINTESIS DE COLAGENA:

Es importante el estudio de la biosíntesis de colágena y sus mecanismos regulatorios ya que esta proteína es - el componente más abundante de los tejidos conjuntivos y está ampliamente involucrada en el proceso fibrótico pulmonar.

La colágena es una de las proteínas que sufren un - mayor número de modificaciones postraduccionales. La síntesis de colágena se puede dividir en dos estadios: a) eventos intracelulares requeridos para ensamblar y secretar las moléculas de procolágena y b) eventos extracelulares que convierten a la molécula de procolágena en colágena y la incorporan en una fibrilla por medio de uniones covalentes.

La molécula de colágena es sintetizada inicialmente como un precursor llamado procolágena, formada por la asociación de tres cadenas pro- α . Una vez que los ARN's mensajeros de procolágena se transcriben y procesan, son transportados al citoplasma y posteriormente se integran a los polisomas - que se unen a las membranas del retículo endoplásmico rugoso (RER) (44).

Cada cadena pro- α se sintetiza independientemente-

y contiene una región colagénica (Gli-X-Y)_n así como extensiones peptídicas en las regiones amino y carboxilo terminales. Cada molécula de pro- α tiene un peso molecular aproximado de 150,000 daltones correspondiendo 20,000 daltones a la extensión amino terminal y 30,000 daltones a la del carboxilo terminal..

Diversos estudios han demostrado la presencia de - 100 residuos de aminoácidos adicionales en la región del - amino terminal, los cuales contienen una secuencia de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos hidrofóbicos, la - - cual dirige el movimiento de la cadena naciente de pro- α a través del retículo endoplásmico rugoso (45,46). Este - segmento es separado por una endopeptidasa específica. Una vez que empieza a pasar la cadena pro- α a las cisternas - del RER se inician las modificaciones postraduccionales que se describen a continuación: primero se hidroxilan ciertos residuos de prolina y lisina, posteriormente se glicosilan algunos residuos de hidroxilisina en la región colagénica, - a los que se le adiciona galactosa y después glucosa form--mando glucosilgalactosil hidroxilisil, finalmente se glico--sila el péptido carboxilo terminal y se forman puentes di--sulfuro inter o intracadena entre las tres regiones carboxilo terminales y exclusivamente intracadena en las regiones amino terminales.

Por ensamble específico de tres cadenas pro- α se forma la triple hélice de procolágena, de aproximadamente 450,000 daltones. Esta molécula pasa al aparato de Golgi - en donde se empaqueta en las vesículas secretoras y finalmente se exporta de la célula.

En el ámbito extracelular la molécula de procolágena se transforma en colágena por la pérdida de los propéptidos carboxilo y amino terminales mediante enzimas específicas. Las moléculas de colágena resultantes quedan con un peso molecular aproximado de 300,000 daltones. Estas se unen covalentemente entre sí formando fibras específicas para cada tipo de colágena durante la fibrillogénesis. Para este fin, la enzima lisil-oxidasa cataliza la desaminación oxidativa de grupo E- amino de ciertos residuos de lisina o hidroxilisina, produciendo aldehídos reactivos que por condensación aldólica forman 2 tipos de unión covalentes: intra o intermoleculares.

DEGRADACION DE COLAGENA:

La estructura y la función del pulmón depende íntimamente de la integridad de los elementos del tejido conjuntivo comprendidos en la estructura alveolar (47).

Las macromoléculas que integran la estructura alveolar, entre ellas colágena, elastina, proteoglicanos y otras glicoproteínas proveen el armazón que permite al pul

món tener una arquitectura para efectuar el intercambio gaseoso y las características mecánicas que ocurren durante el ciclo respiratorio.

Una de las consecuencias más devastadoras de la inflamación del pulmón resulta de la acción de las proteasas que degradan los componentes del tejido conjuntivo dentro de las estructuras alveolares; las principales proteasas descritas en enfermedades inflamatorias crónicas que afectan los componentes alveolares son, colagenasa, elastasa y catepsina G. Estas proteasas pueden tener una importancia en la patogénesis de la enfermedad pulmonar, ya que sus sustratos incluyen las principales proteínas estructurales del tejido conjuntivo (ver tabla IV).

COLAGENASAS:

Estas enzimas son metaloproteínas dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+} con un pH óptimo de 7.5 - 8.5, sin actividad en pH ácido. Generalmente son secretadas en forma de zimógenos inactivos, necesitando proteólisis parcial para la generación de la enzima activa (48).

La acción de una colagenasa clásica se distingue por ser específica por su sustrato (colágena). Degrada a las moléculas de colágena nativa en 2 fragmentos, el TC^{A} que representa el 75% de la molécula (comprendiendo el amino terminal del sustrato) y el TC^{B} que comprende el

25% restante (abarcando al carboxilo terminal del sustrato). Esta acción se ha descrito para colágenas tipo I y III que como se mencionó constituyen alrededor del 90% en la matriz intersticial pulmonar.

Por otro lado las células pulmonares que se sabe liberan colagenasa son: los macrófagos alveolares (49,50), fibroblastos pulmonares (52) y neutrófilos (53).

La colagenasa es liberada en forma inactiva y no se conoce cual es el mecanismo que in vivo promueve la activación, pero posiblemente sea mediada por proteasas neutras, como ha sido sugerido en algunos modelos experimentales (54).

Los mecanismos que permiten la liberación de - - colagenasa no se conocen con exactitud, pero se sabe que - diversos estímulos inflamatorios promueven una rápida liberación de esta enzima de neutrófilos y macrófagos (49).

En cuanto a la especificidad, tal como ocurre con las colagenasas extrapulmonares humanas, las colagenasas - de macrófagos y de fibroblastos degradan colágena tipo I y III contrastando con la colagenasa de neutrófilos que ataca solo tipo I pero no tipo III.

Recientemente, se ha descrito otra colagenasa que degrada específicamente colágena tipo V (55).

En el parénquima pulmonar normal del humano las únicas fuentes de colagenasa son los macrófagos y fibroblastos, que posiblemente sean responsables del recambio de colagenas intersticiales. Pero en el caso de desórdenes crónicos inflamatorios, los neutrófilos y/o eosinófilos pueden también contribuir a la degradación de colagenas (56).

INHIBIDORES DE LA COLAGENASA:

Es importante considerar que la acción de la colagenasa se encuentra regulada por diversos factores, entre ellos la presencia de calcio, el pH del medio, la existencia de activadores y de inhibidores. La naturaleza precisa de la actividad de inhibidores de colagenasa en las estructuras alveolares es desconocida; no han sido identificados inhibidores para las colagenasas producidas por células inflamatorias o residentes del alveólo, como colagenasas de macrófagos alveolares, neutrófilo y eosinófilo.

Los posibles inhibidores de colagenasa relevantes fisiologicamente al metabolismo de la colágena alveolar son la α_2 -macroglobulina y la B_1 - anticolagenasa, ambas circulantes en el suero. Sin embargo la α_2 -macroglobulina debido a su alto peso molecular de 725,000 daltones, es excluida como inhibidor de colagenasa alveolar debido a su difícil acceso al interior del intersticio alveolar, en cam

bio para la B₁- anticolagenasa este acceso parece más sencillo debido a que su peso molecular es de 50,000 d. y pudiera ser que actúe como inhibidor de la colagenasa alveolar - (82).

Además de estos 2 inhibidores séricos de la colagenasa se conocen otros que son liberados por tejidos específicos, tales como el inhibidor derivado de tendón, con un peso molecular de 25,000 d. y el producido por fibroblastos dérmicos con un PM de 31,000 d. ambos específicos para colagenasa (83); aquel producido por cartílago auricular bovino y aorta con un PM de 11,000 d. que es una proteína catiónica y el grupo conocido como inhibidores de las metaloproteinasas tisulares (TIMP) que inhiben entre otras a la colagenasa (84).

TABLA I (88).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, FISIOPATOLÓGICAS Y ANATOMO-
PATOLOGICAS DE LA FIBROSIS PULMONAR DIFUSA.

Características clínicas :

Insuficiencia respiratoria progresiva.

Tos

Hipertensión pulmonar.

Radiografías pulmonares con infiltrados pulmonares bilaterales difusos, predominante en la base de los pulmones, con apariencia reticulares, nodulares o de vidrio despulido.

Síntomas extrapulmonares (taquipnea, fatiga, pérdida de peso.

Características fisiopatológicas:

Volumenes pulmonares reducidos (incluyendo capacidad residual funcional).

Capacidad de difusión disminuida (para CO)

Hipoxemia arterial.

Rendimiento pulmonar reducido (con respiración rápida).

Presión arterial en reposo disminuida.

Presión parcial arterial-alveolar aumentada.

Características anatómo-patológicas;

Inflamación intersticial heterogénea.

Presencia de macrófagos y de neumocitos tipo II en los espacios alveolares.

Aumento irregular de tejido fibroso.

TABLA II (26).

FIBROSIS PULMONAR DIFUSA

ETIOLOGIA

- 1.- De causa desconocida
 - Fibrosis pulmonar idiopática
- 2.- De causa conocida
 - a) Inhalación de polvos inorgánicos (sílice, asbesto etc)
 - b) Inhalación de polvos orgánicos:
 - Proteínas aviarias (palomas, patos, gallinas etc.)
 - Microorganismos (Termoactinomices vulgaris, Termoactinomices sacharii, Micropolispora faenii, etc.)
 - c) Drogas:
 - Antineoplásicas.- (busulfan, bleomicina, ciclofosfá- mida, metotrexate, etc.)
 - Antibióticos.- (nitrofurantoínas, sulfonaminas)
difenilhidantoínas, propanol, hexametonio.
 - d) Gases, humos, vapores y aerosoles:
 - Gases: Oxígeno, dióxido de azufre.
 - Humos: Óxido de zinc, cobre, cadmio, fierro y magne- sio.
 - Vapores: mercurio, diisocianato de tolueno.
 - Aereosoles: grasas, piretro.
 - e) Radiaciones
 - f) Venenos: paraquat
 - g) Asociada a enfermedades colágeno-vasculares:
 - Lupus eritematoso sistémico
 - Artritis reumatoide
 - Esclerosis sistémica progresiva
 - Dermatomiositis.
 - h) Otras.

TABLA III (33).

TIPOS DE COLAGENA EN MAMIFEROS, CARACTERISTICAS Y DISTRIBUCION

TIPO	CADENAS POLIPEPTIDICAS	PM APARENTE (daltones)	FORMULA MOLECULAR	CARACTERIS TICAS.	DISTRIBUCION EN TEJIDOS
I	$\alpha 1(I)$	95,000	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$	Baja en hi- droxilisi- na e hidroxili- sina glico- silada	Todos los-- tejidos con juntivos.
	$\alpha 2(I)$	95,000			
I trí- mero	$\alpha 1(I)$	95,000	$[\alpha 1(I)]_3$	Similar a - tipo I	Tendón, den- tina, piel, tumores...
II	$\alpha 1(II)$	95,000	$[\alpha 1(II)]_3$	Relativamen- te alta en- hidroxilisi- na e hidro- xilisi- na glico- silada.	Cartílago, membranas de Bowman.
III	$\alpha 1(III)$	95,000	$[\alpha 1(III)]_3$	Alta en hi- droxiproli- na y baja en hidroxilisi- na, con unio- nes disulfu- ro intercade- na.	Parénquima pulmonar, útero, mús- culo cardí- aco, hígado- piel.
IV	$\alpha 1(IV)$	140,000	$[\text{pro-}\alpha 1(IV)]_3$	Alta en hi- droxilisi- na glico- silada, alvéolos - con regiones globulares. Contiene 3- hidroxipro- lina.	Membranas- basales, - alvéolos - pulmonares.
V	αA	104,000	$[\alpha A]_3$		
	αB	99,000	$[\alpha B]_3$	Similar a ti- po IV	Membranas- basales, - pulmón, - placenta
			$\alpha A \alpha B$		

CONTINUA TABLA III (36-38).

TIPO	CADENAS POLIPEPTIDICAS	PM APARENTE (daltones)	CARACTERIS TICAS	DISTRIBUCION EN TEJIDOS.	
VI Colágena Intima	Tipo A	SC2 SC2 SC3	50,000- 70,000 cada una	Alta en hidro- xilisina menor contenido de - hidroxiprolina y de glicina - que en otras - colágenas, con una región glo- bular no cola- génica en cada extremo, unidas por puentes di- sulfuro.	Membrana ba- sal de endo- telios de - placenta, ri- ñón y aorta humana.
	Tipo B	Acidá Acida Básica	50,000- 70,000 cada una		
VII Colágena de cadena larga o IC	IC IC IC	170,000- 180,000 cada una	90% de triple - hélice, más lar- ga que las otras siete tipos de - colágenas, cade- nas unidas por- puentes disulfu- ro con más ciste- ina que otras co- lágenas, carece de 3-hidroxi-pro- lina.	Membranas co- rioamnióticas, placenta y -- cartílago neo- natal humano.	
VIII Colágena Endotelial o EC.	EC ₁ EC ₂ EC ₃	177,000 125,00 100,000	No posee puentes disulfuro inter- catenarios, care- ce de propéptidos amino y carboxilo terminales, posee regiones globula- res en ambos ex- tremos.	Endotelios - bovinos, arte- ria pulmonar, vena cava y - córnea, sarco- mas y carcino- mas.	

CONTINUA TABLA III (85-87).

TIPO	CADENAS POLIPEPTIDICAS	PM APARENTE (daltones)	CARACTERIS TICAS	DISTRIBUCION EN TEJIDOS.
IX	α_1 (IX) α_2 (IX) α_3 (IX) (sugeridas)	84,000 68,000	3 regiones colagénicas separadas - por regiones no - colagénicas, residuos de cisteina, carboxilo y amino terminales más pequeños que en - - otras colágenas, - unidas covalentemente a glucosaminoglucanos, sensible a colagenasa y condroitinasa. Temperatura de fusión 48 y 45°C.	Cartílago es ternal de pollo.
X	α_1 (X)	59,000	Regiones globulares y colagénicas. Temperatura de fusión 47°C.	Epífisis de cartílago en tibiatarso de embrión de pollo. En hipertrofia de condrocito y hueso durante la osificación.

TABLA IV (82).

PROTEASAS DE TEJIDO CONECTIVO QUE PARTICIPAN EN LA ENFERMEDAD
CRONICA INFLAMATORIA DE ESTRUCTURA ALVEOLAR.

Proteasa	Origen celular	Presencia en pulmón normal	Forma cuando se libera	S U S T R A T O S								
				Colágena tipo				Elasti	Otras glico			
				I	III	IV	V	na		proteí	nas	
												P F L
	Macrófago alveolar	Sí	Latente	Sí ^a	Sí ^a		^b	No	No	No	No	No
Colagena sa.	Fibroblasto	Sí	Latente	Sí	Sí ^a			No	No	No	No	No
	Neutrófilo	No	Activa	Sí ^a	No			No	No	No	No	No
	Eosinófilo	No	?	Sí ^a	Sí ^a			No	No	No	No	No
Elastasa	Macrófago alveolar	Sí	Activa	?	?		?	Sí	?	?	?	?
	Neutrófilo	No	Activa	No ^c	Sí ^d		No	Sí	Sí	Sí	?	?
Catepsina G	Neutrófilo	No	Activa	No ^c	No	No	?	Sí ^e	?	?	?	?

P = Proteoglicanos, F= Fibronectina L= Laminina

- a) Sitio de ataque de la colagenasa clasica cerca de 3/4 de longitud de la molécula de N-terminal de colágena tipo I y III.
- b) Macrófagos cultivados producen una metaloproteínasa que degrada colágena tipo V
- c) Ataca N y C terminales no helicoidáles (telopeptidos) de la molécula de colágena, pero no degrada tipo I.
- d) Sitio de rompimiento en una región de la triple helice de colágena - tipo III.
- e) El rompimiento de la elastina por la catepsina G es 10 veces menor - que la ruptura producida con la elastasa de neutrófilo.

HIPOTESIS:

El incremento de la colágena en la fibrosis pulmonar idiopática se debe a un aumento en la biosíntesis y/o a una disminución en su degradación.

OBJETIVOS:

- I; Corroborar que en la fibrosis pulmonar idiopática existe un aumento en la concentración de colágena.

- II; Demostrar que el incremento de esta proteína se debe a modificaciones en la biosíntesis y/o degradación.

PACIENTES Y METODOS

POBLACION DE ESTUDIO:

Se estudió el tejido pulmonar obtenido por biopsias a cielo abierto en 11 pacientes con fibrosis pulmonar -- idiopática (4 hombres y 7 mujeres) y 6 sujetos controles- (3 hombres y 3 mujeres).

Los pacientes presentaban todas las característi-- cas clínicas descritas en la FPI (1-9) (ver tabla I).

Los hallazgos morfológicos de las biopsias incluye ron fibrosis septal alveolar difusa, e inflamación intersti cial e intraalveolar, con celulas mononucleares, neutrófi-- los y ocasionalmente eosinófilos.

Con microscopía de luz polarizada no se encontra-- ron evidencias de granulomas, vasculitis o material inorgá-- nico.

Los cultivos de las biopsias fueron negativos a - bacterias, micobacterias y hongos.

La edad de los pacientes osciló entre 28 y 58 años con un promedio de 38.7 ± 8.7 .

Los controles fueron seleccionados de individuos - lobectomizados o de biopsias de tumor pulmonar primario. En ninguno de estos sujetos hubo evidencias, clínicas, radioló gica o fisiológica de enfermedad pulmonar difusa, ni lesio-- nes histológicas compatibles con fibrosis en la muestra de-

tejido usada para el análisis químico.

La edad de los sujetos control fué de 29 a 58 años con un promedio de 42.5 ± 10.3 .

CUANTIFICACION DE COLAGENA:

Se tomaron porciones de aproximadamente 50 mg de tejido, las cuales se secaron con papel filtro estéril y se llevaron a peso constante (peso seco). Con este objeto las muestras de los tejidos fueron deshidratadas a 100°C de temperatura (estufa Thelco).

Posteriormente el tejido se hidrolizó con HCl 6 N dentro de una ampolleta de vidrio al vacío, que se incubó a 100°C durante 24 horas.

Después de la incubación el hidrolizado se filtró al vacío y posteriormente se procedió a la evaporación del ácido clorhídrico y neutralización.

Finalmente las muestras se resuspendieron en agua destilada, de donde se tomaron alícuotas para la determinación de la hidroxiprolina. El método utilizado para cuantificar colágena se basa en la determinación colorimétrica de la hidroxiprolina, tomando en cuenta que este iminoácido -- forma parte importante de esta proteína (10-14%) y prácticamente no se encuentra en otras proteínas, salvo raras -- excepciones (C_{1q} , acetilcolinesterasa) y en niveles muy -- bajos.

El método utilizado para la medición de la hidroxiprolina fué el de Rojkind y González (57).

DETERMINACION COLORIMETRICA DE LA HIDROXIPROLINA:

Las alícuotas de las muestras y de la solución estándar de hidroxiprolina se hicieron reaccionar con cloramina T con el fin de oxidar al iminoácido, deteniendo la reacción con tiosulfato de sodio, añadiendo posteriormente hidróxido de sodio y cloruro de sodio para aumentar la extracción del producto oxidado.

Las muestras fueron calentadas a ebullición por 30 minutos para oxidar a la hidroxiprolina a la forma pirrólica, para extraer posteriormente dicho pirrol con tolueno en agitación por 30 segundos. Finalmente el pirrol se hizo reaccionar con el reactivo de Ehrlich, determinando su absorbancia a los 30 minutos, en un espectrofotómetro (Beckman - Model 25) a 560 nm.

Los resultados fueron expresados como:
mg de colágena / g de tejido seco.

BIOSINTESIS DE COLAGENA:

Las muestras de pulmón fueron divididas en 2 porciones con un peso aproximado de 100 a 200 mg de peso. Estas alícuotas fueron incubadas en 3 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco, conteniendo 10% de suero fetal de ternera-

0.018 mg de ácido ascórbico, 0.064 mg de sulfato ferroso, 300 U de penicilina, 300 U de estreptomicina y 300 U de kanamicina.

Los cultivos fueron equilibrados con 95% de O_2 - 5% CO_2 e incubados a $37^\circ C$ en un agitador con baño de agua.

Después de 1 hora el medio fué reemplazado con 3 ml de medio fresco conteniendo $30\mu Ci$ de $(2,3-^3H)$ -prolina, ($32.2 Ci/mol$, New England Nuclear, Boston, Mass) y el tejido fué incubado por 4 horas adicionales.

Al final del período de incubación, las muestras de tejido fueron homogenizadas con un homogenizador de tejido-Polytron (Brinkman Instruments, Inc, Westbury N.Y.) en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y lavado 3 veces con TCA al 5%. Este material precipitable con TCA fué hidrolizado por 24 horas con HCl 6 N a una temperatura de $100^\circ C$; el hidrolizado se filtró al vacío y posteriormente se procedió a la evaporación del ácido clorhídrico y neutralización de las muestras.

Se tomaron alícuotas de las muestras para medir hidroxiprolina radiactiva y prolina radiactiva por el método de Rojkin y col. (57).

Con el objeto de oxidar a los iminoácidos de las muestras al igual que los estándares de prolina [3H] y de hidroxiprolina [3H], se hicieron reaccionar con cloramina T, deteniendo la reacción con tiosulfato de sodio, poste-

riormente se añadieron hidróxido de sodio y cloruro de sodio para aumentar la extracción del producto oxidado; para extraer la prolina-[^3H] se adicionó tolueno y se agitó fuertemente.

La radiactividad fué determinada en tolueno POPOP en un contador de centelleo líquido (Beckman LC 100C).

Posteriormente se lavó 3 veces con tolueno para eliminar la prolina-[^3H] remanente.

La fase acuosa que queda al extraer la prolina - - [^3H] se sometió a ebullición por 30 minutos para oxidar la hidroxiprolina-[^3H] a la forma pirrólica. Para extraer la hidroxiprolina-[^3H] se sigue el mismo procedimiento que para la prolina-[^3H].

Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje de síntesis de colágena en relación a otras proteínas, multiplicando por un factor de corrección de 5.04 (58) dado el contenido más bajo de prolina en las proteínas no colagénicas.

CALCULOS PARA BIOSINTESIS DE COLAGENA:

$$1.- \% \text{ de Síntesis} = \frac{2\text{cpm de OH-PRO}}{2\text{cpm de OH-PRO (5.04 x cpm PRO)}} \times 100$$

Donde;

5.04= Porque en proteínas no colagénicas por cada 100 residuos de aminoácidos se encuentra un mínimo de 5.04 residuos de prolina.

cpm.= Utilizadas en la fórmula es igual a cpm -- leídas en el contador x 1.2 x 4 x Eficiencia.

1.2 = Porque cada iminoácido tritiado se extrae con 6 ml de tolueno de los cuales 5 ml se mezclan con tolueno POPOP para determinar radiactividad.

4 = Ya que se evaluaron los iminoácidos radiactivos tomando alícuotas de 0.5 ml de una solución de 2 ml.

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA:

EL método utilizado fué el de Ryan y Woesner con -- modificaciones (59), el cual se basa en evaluar la actividad colagenolítica utilizando como sustrato las colágenas -- presentes en el mismo tejido y con la enzima (colagenasa) -- también presente en este.

Las muestras de tejido fueron homogenizadas con un homogenizador de tejido Polytron (Brinkman Instruments, Inc, Westbury N.Y) en un amortiguador Tris 0.1 M pH 7.8. Este -- homogenizado se dividió en 6 alícuotas, de las cuales tres fueron incubadas en un baño metabólico en agitación por 24 horas a 37°C en presencia de CaCl_2 0.005M, NaCl 0.15M y Tris 0.04M pH 7.4.

Las otras 3 alícuotas fueron incubadas en la misma forma pero con EDTA 0.05M (inhibidor de colagenasa).

Después de 24 horas se paró la incubación agregando 0.1 ml de EDTA a aquellas alícuotas que no lo contenían y -- 0.1 ml de amortiguador Tris HCl pH 7.4 a aquellas alícuotas que sí contenían EDTA. Posteriormente se centrifugó 20 minutos a 6000 rpm a 4°C y el sobrenadante fué filtrado a través de una membrana, la cual tiene un límite de exclusión -- máximo de 100,000 dalton (Diaflo XM-100, Amicon Comp, Lexington, Mass) con el objeto de obtener fragmentos menores que las cadenas alfa de la colágena.

El sobrenadante filtrado se hidrolizó en HCl 6 M a

100°C por 24 horas y posteriormente se filtró al vacío y -- evaporó para medir hidroxiprolina.

Por otra parte, se pesó un fragmento del mismo pulmón y se hidrolizó a 100°C, con HCl 6 M por 24 horas, se -- filtró y evaporó para posteriormente determinar la concentración de colágena y con este dato obtener la colágena total incubada en cada una de las muestras ya que se conoce -- el peso del fragmento.

Los resultados de la actividad colagenilítica fueron expresados como:

[μg de colágena soluble/mg de colágena incubada] -

[μg de colágena soluble en el control (EDTA)/mg de colágena incubada =

μg de colágena degradada/mg de colágena incubada.

METODO ESTADISTICO:

Para cada parámetro estudiado los valores en ambos grupos (pacientes, controles) fueron promediados y se calculó la desviación estándar de la media.

La significación estadística de los diferentes valores en los dos grupos fué calculada usando la prueba t de Student.

Toda probabilidad de que el resultado se deba al azar menor de 0.05 fué considerada significativa.

Los resultados fueron expresados como Media \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm d.e.$).

RESULTADOS:

ESTUDIO MORFOLOGICO:

En todas las muestras de los pacientes hubo un claro predominio de lesiones fibróticas sobre lesiones inflamatorias (figs. A1, A2, A3 y A4).

ESTUDIO BIOQUIMICO:

CONCENTRACION DE COLAGENA:

En la fig. 1 y tablas 1 y 2 se muestran los resultados de la concentración de colágena en pacientes con FPI y controles. Como fué demostrado previamente (27,28) - hubo un incremento significativo en la concentración de esta proteína en el tejido obtenido de los pacientes, con un promedio de 327 ± 76 μg de colágena / mg de tejido seco, -- comparado con los controles que fué de 185 ± 18 μg de colágena / mg de tejido seco ($p < 0.001$).

BIOSINTESIS DE COLAGENA:

Tanto los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, como los de los sujetos control incorporaron activamente prolina- $^{[3\text{H}]}$ en proteínas. En la fig. 2 tablas 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos en ambos -- grupos. Como puede observarse no hubo diferencias significativas entre los pacientes (2.2 ± 0.8 %) en relación con los sujetos control (2.08 ± 0.5 %).

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA:

Como puede observarse en la fig. 3, en los homogenados de pulmones obtenidos de pacientes con FPI se encontró una actividad colagenolítica muy baja que fué de 1.718 ± 1.03 μg de colágena degradada / mg de colágena incubada en 24 horas, comparada con los homogenados de pulmón normal -- que fué de 5.416 ± 0.952 μg de colágena degradada / mg de colágena incubada en 24 horas, esto demuestra una disminución de la actividad colagenolítica en los pulmones de los pacientes, la cual fué estadísticamente significativa con una ($p < 0.001$).

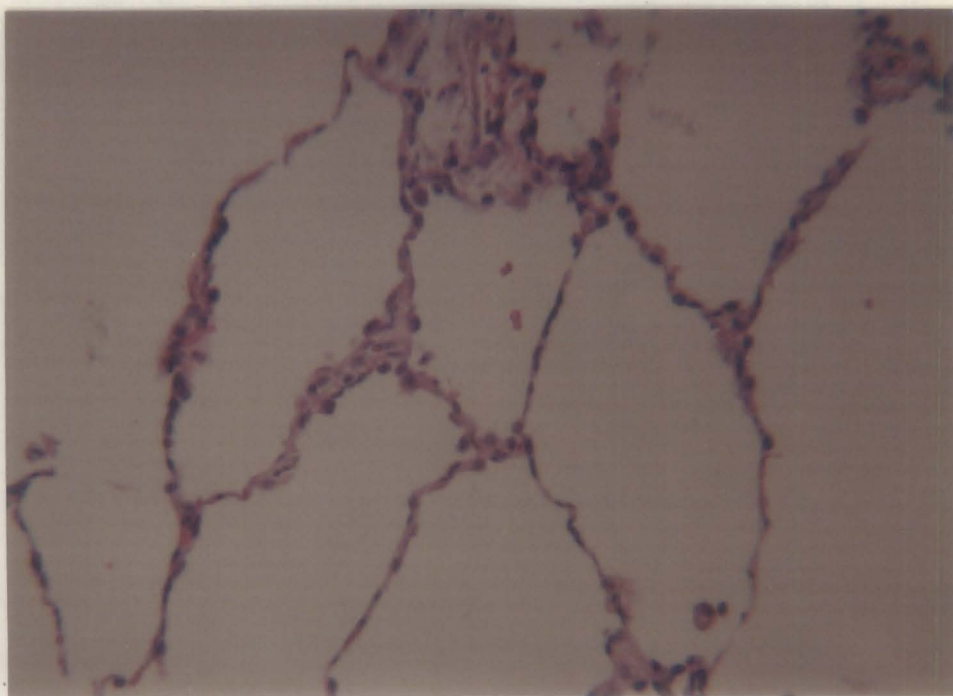


Fig. A1. Micrografía del parénquima pulmonar normal del humano.

Se observa el espesor normal de los tabiques alveolares.

Hematoxilina y eosina (HE), 100 X.

Figs. A2 y A3. Micrografía de un corte de pulmón fibrotico humano.

Se muestran diferentes campos de una lesión con engrosamiento intersticial conteniendo depósito de colágena, infiltrado inflamatorio, con linfocitos, células plasmáticas e histiocitos. Se observa - metaplasia cúbica del epitelio alveolar.

A2 = HE, 160 X

A3 = HE, 100 X.

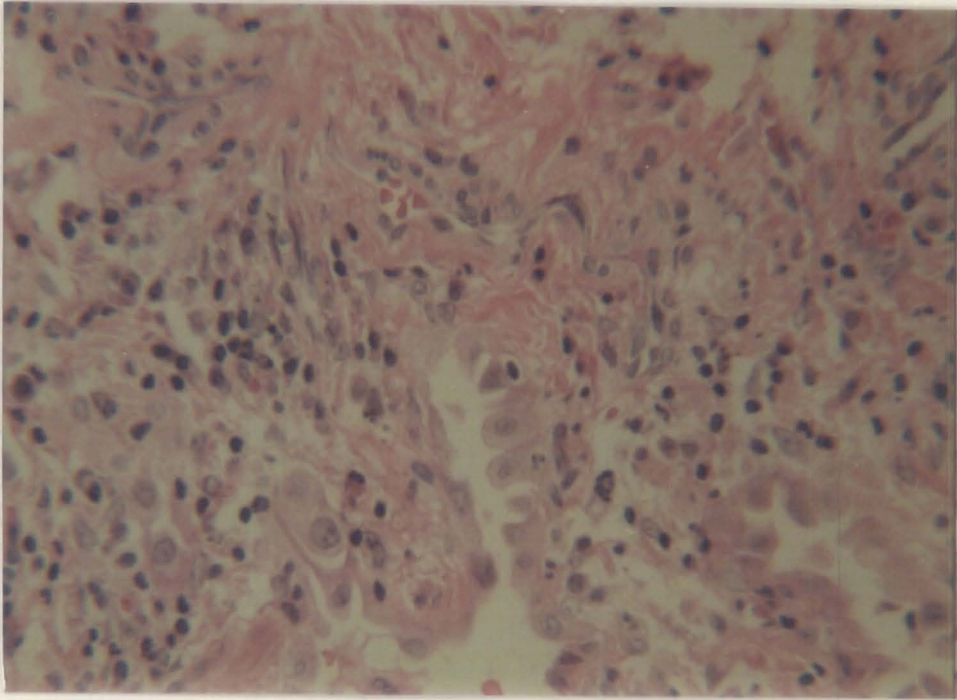


Fig. A2.

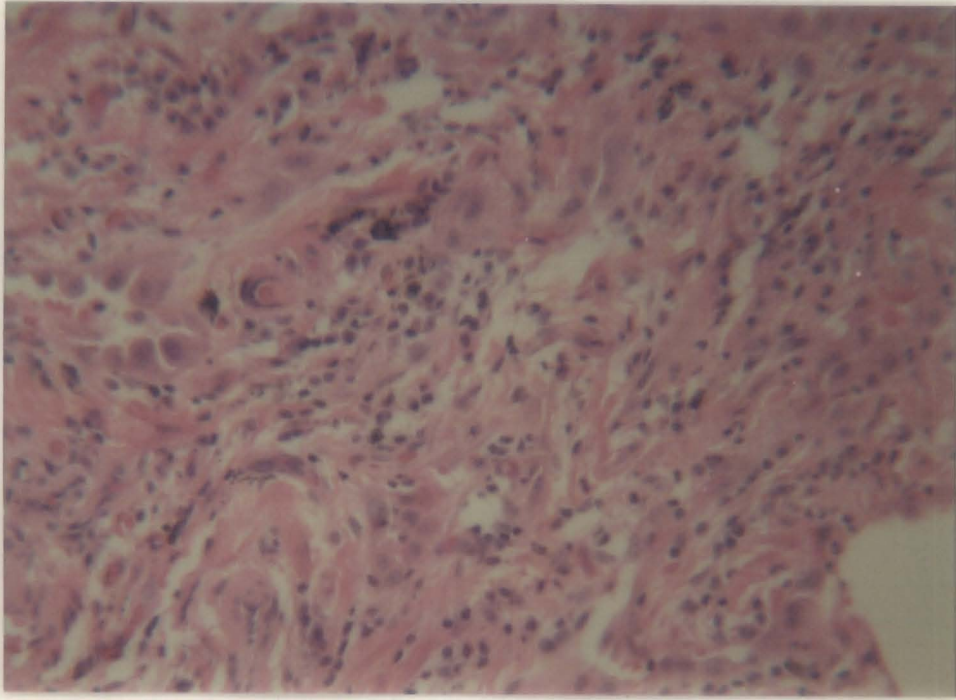


Fig. A3.

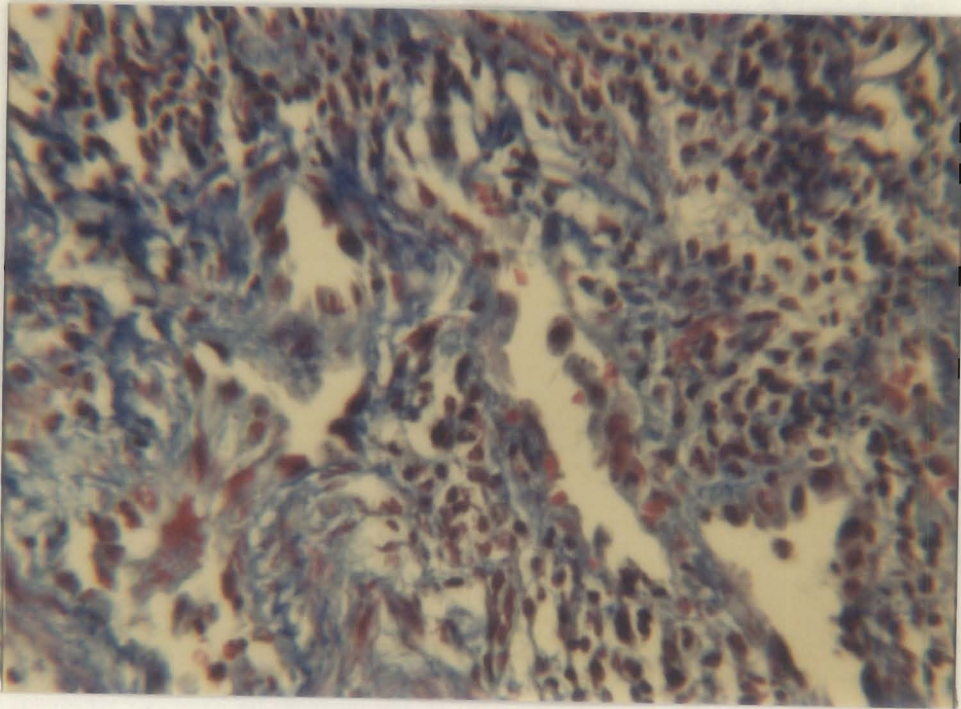


Fig. A4. Micrografía de un corte de pulmón fibrótico humano.

Se observa engrosamiento del intersticio - con depósito excesivo de colágena e infiltrado inflamatorio.

Método tricrómico de Masson, 160 X.

TABLA 1

CONCENTRACION, SINTESIS Y DEGRADACION DE COLAGENA EN
FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA

Pacientes	Concentración de colágena. (μg de colágena/mg de tej. seco)	Síntesis de colágena. (%).	Degradación de colágena. (μg de colágena degradada/mg de colágena incubada en - 24 horas.) .
1	334	3.28	0.24
2	255	3.45	1.776
3	293	2.55	1.344
4	504	1.76	1.536
5	358	1.45	2.736
6	407	1.45	3.24
7	329	2.10	1.944
8	252	1.45	0.48
9	243	1.20	3.336
10	317	3.10	1.128
11	305	2.55	1.152
Media \pm desviación estándar	327 \pm 76	2.20 \pm 0.8	1.719 \pm 1.03

($p < 0.001$) comparada con los controles (ver tabla 2).

TABLA 2

CONCENTRACION, SINTESIS Y DEGRADACION DE COLAGENA EN
SUJETOS CONTROL.

Control	Concentración de colágena. (μg de colágena/mg de tej. seco).	Síntesis de colágena. (%).	Degradación de colágena. (μg de colágena degradada/mg de colágena incubada en - 24 horas).
1	178	2.75	4.512
2	167	1.70	5.184
3	202	1.45	7.176
4	180	2.30	5.304
5	212	1.80	5.616
6	171	2.50	4.704
Media \pm desviación estándar.	185 \pm 18	2.08 \pm 0.5	5.416 \pm 0.952

FIGURA 1 :

Cuantificación de colágena en parénquima pulmonar de pacientes con FPI y sujetos control.

El valor de la media para todos los pacientes - en cada grupo es indicado por una barra horizontal.

Los valores individuales con la media y desviación estándar son mostrados en la tabla 1 y 2 - - (p < 0.001).

CONCENTRACION DE COLAGENA
($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido seco)

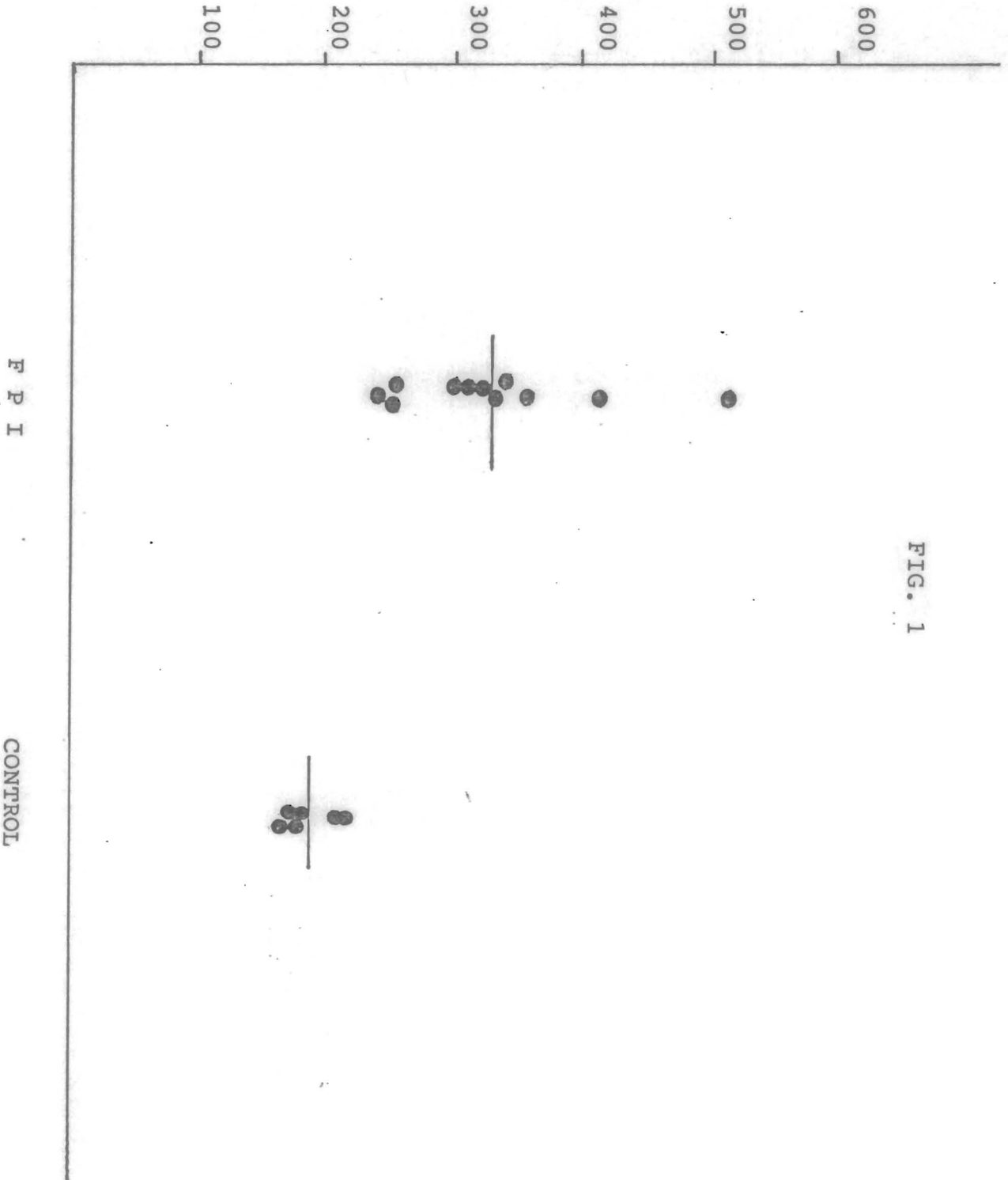


FIG. 1

FIGURA 2 :

Comparación del porcentaje de síntesis de colágena en biopsias de pulmón de pacientes con FPI y sujetos control. Los valores de la media son mostrados con una barra horizontal ..

En las tablas 1 y 2 se anotaron los valores individuales, la media y desviación estándar - - (p < 0.001).

FIG. 2

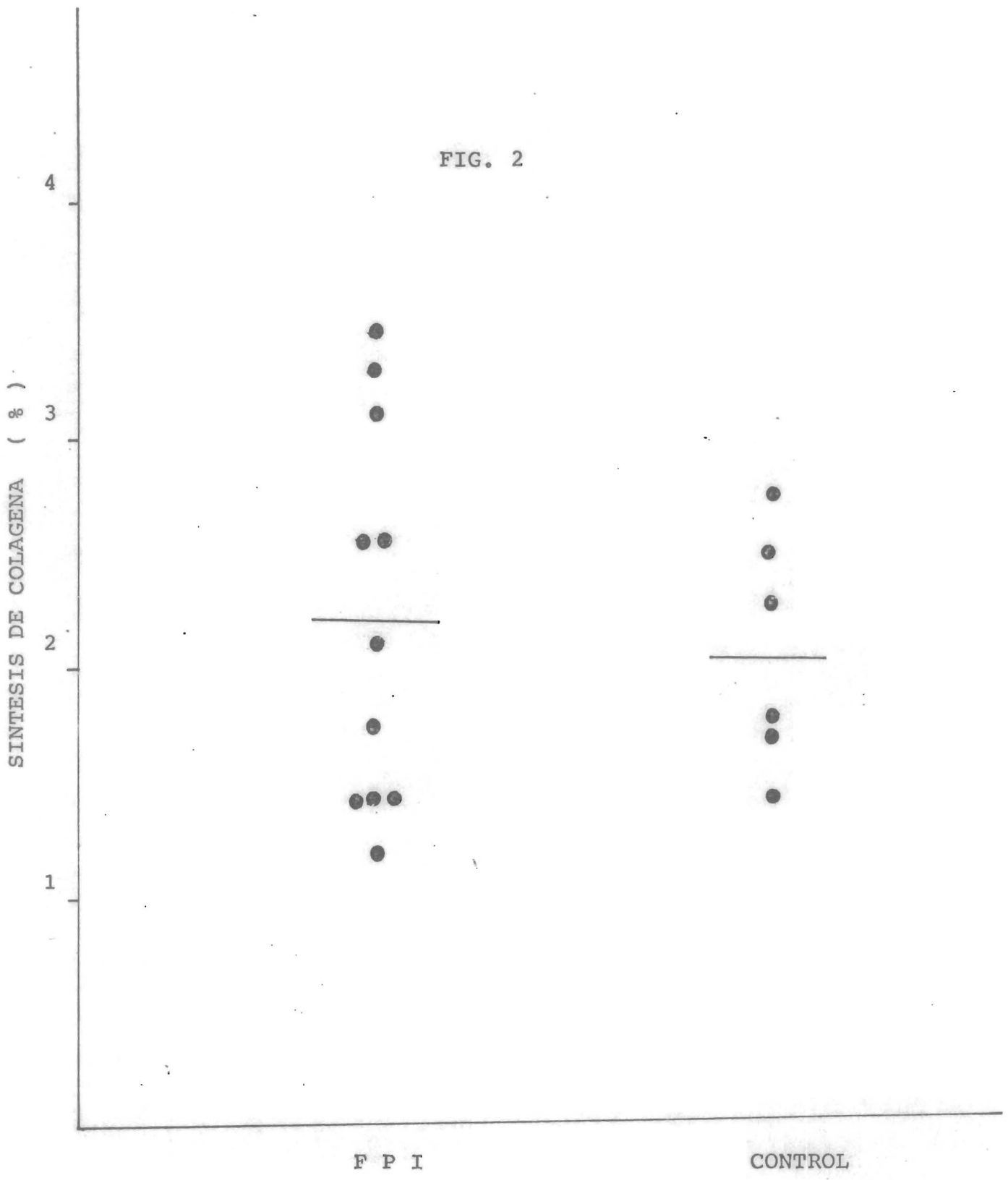


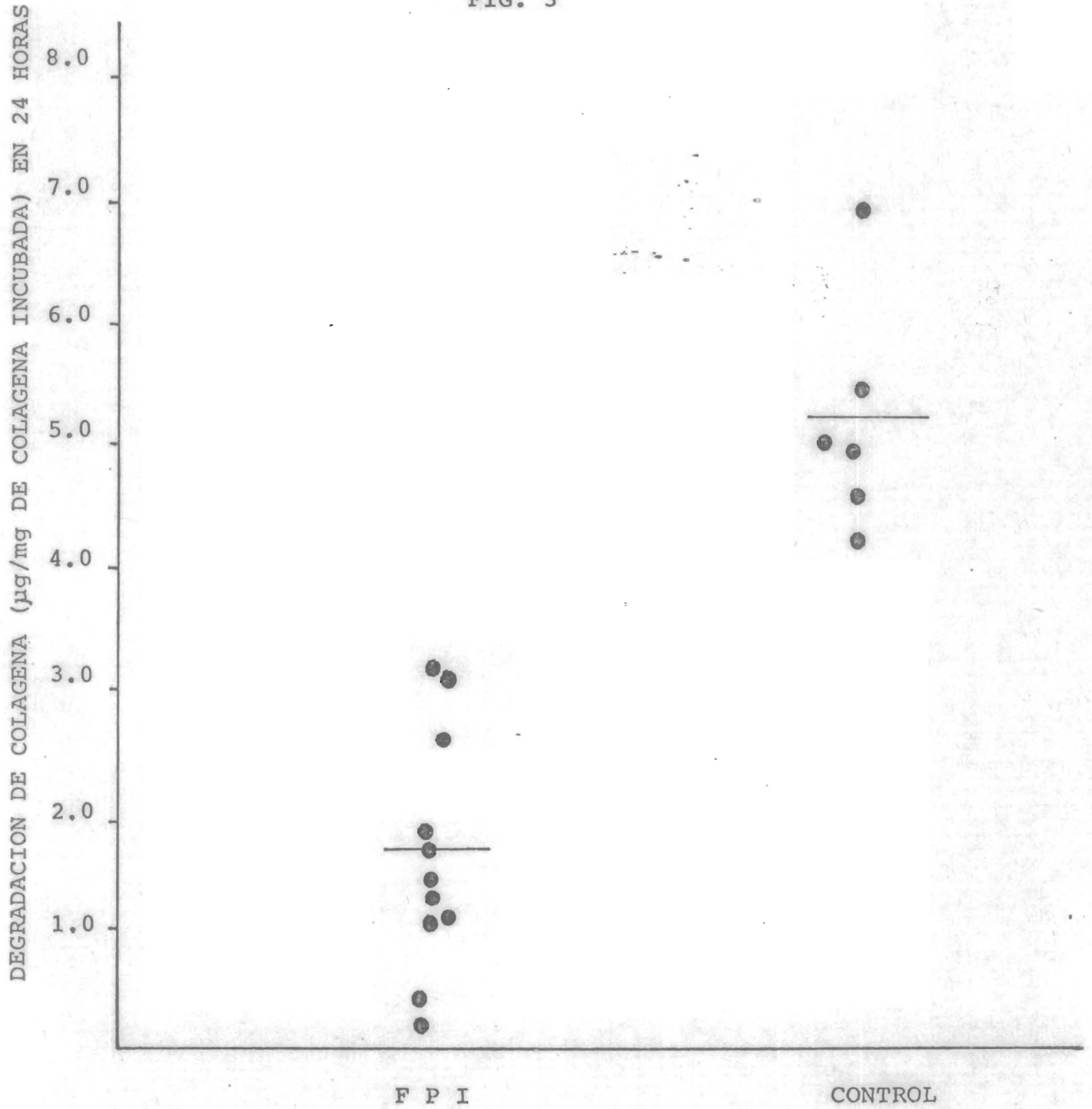
FIGURA 3:

Actividad colagenolítica en homogenados de pulmón de pacientes con FPI y sujetos control.

Los valores de la media son mostrados con una barra horizontal.

En las tablas 1 y 2 se anotaron los valores individuales, la media y desviación estándar ($p < 0.001$).

FIG. 3



DISCUSION:

La acumulación de colágena en cantidad excesiva y localizaciones anormales, es el evento patológico principal que define la respuesta fibrótica al daño en muchos tejidos (69-72), y estos resultados demuestran que el pulmón no es la excepción.

El hallazgo de un incremento de la cantidad de colágena de los pacientes con FPI en el presente estudio, contrasta con el reportado por el grupo de Fulmer J.D. y cols. (24) en el que se evaluó el grado de fibrosis, tanto desde el punto de vista morfológico como bioquímico, en 9 pacientes con FPI y 6 sujetos control, sin encontrarse diferencias significativas en el contenido de colágena entre -- ambos grupos. Los autores tampoco observaron una correlación entre el grado de fibrosis detectada histologicamente y la cantidad de colágena medida bioquimicamente.

Fulmer sugiere, de acuerdo con ese estudio, que la FPI es una enfermedad caracterizada por una alteración en la proporción relativa de los tipos genéticos de colágena pulmonar junto con un desarreglo topográfico, sin que exista un incremento en el contenido pulmonar de esta proteína.

Sin embargo, nuestros hallazgos de que la colágena pulmonar está aumentada en los pacientes con FPI, está de acuerdo con las observaciones de Madri y Furthmayr (7). En ese trabajo, se estudiaron biopsias pulmonares de pacien

tes con FPI y normales, empleando técnicas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos para 4 tipos genéticos de colágenas. El análisis de las colágenas tipo I, III, IV y AB₂(V), demostró cambios notables en la cantidad relativa y localización de las colágenas en los pulmones con FPI respecto a los sujetos normales. Este trabajo de Madri y otros realizados previamente en nuestro laboratorio (27,28), apoyan el concepto de que la FPI es un proceso patológico en el que existe un aumento en el contenido de colágena.

No obstante, estos estudios proporcionan muy pocas respuestas y originan muchas preguntas. La fibrosis pulmonar idiopática no es probablemente una enfermedad única. El término se refiere a una alteración patológica muy compleja que puede resultar de la agresión al parénquima pulmonar -- originada por diversos agentes etiológicos desconocidos, -- que provocan modificaciones en el número, tipo y localización de las poblaciones celulares del pulmón y en la producción de mediadores responsables de la respuesta fibrótica posterior al daño. En este sentido (89) destacan fundamentalmente factores quimiotácticos para fibroblastos que derivan de diferentes fuentes, como C₅ (componente C₅ del complemento) que proviene de la circulación, la fibronectina secretada por macrófagos y una proteína de 22,000 daltones de PM producida por linfocitos. Se ha descrito además -

que diferentes péptidos, productos de degradación de proteínas de la matriz intersticial son también potentes agentes-
quimiotácticos para fibroblastos.

Por otro lado, se han descrito diversos factores -- que estimulan la proliferación local de fibroblastos; estos factores, son producidos por lo menos por 3 tipos de células diferentes, las cuales se encuentran incrementadas en la FPI como son los macrófagos, linfocitos y plaquetas.

Sin embargo, independientemente de estos fenómenos, para que exista un aumento en el depósito de colágena en el parénquima pulmonar, la característica biológica final debe estar representada por un desequilibrio en el balance entre la producción y degradación de esta proteína, donde la primera debe exceder a la segunda. Hipoteticamente, esto se puede explicar de tres formas:

- a) Aumento de síntesis con degradación disminuida
- b) Aumento de síntesis con degradación normal.
- c) Síntesis normal con degradación disminuida.

En este contexto, nuestros resultados demuestran que en los pulmones con FPI no existe un incremento en la síntesis de colágena, Este hallazgo puede explicarse de varias maneras. Los pacientes estudiados en este trabajo, se encontraban en etapas avanzadas de su padecimiento, con un gran predominio de las lesiones fibróticas sobre las inflamatorias. Es posible que en estadios más tempranos, donde predomina-

la inflamación y la fibroproliferación, exista un aumento en la síntesis de colágena, tal como se ha observado en algunos modelos animales (60-62).

Por otro lado, si existe un aumento en la producción de proteínas no colagénicas, el % de síntesis de colágena - puede mantenerse sin cambio aparente, aún cuando en términos absolutos, ésta se encuentre aumentada. Sin embargo, la incorporación de hidroxiprolina tritiada por gramo de tejido fué muy similar para los pacientes con FPI y los controles, por lo que este no parece ser el caso. Finalmente, es posible que el sistema de ensayo in vitro, no sea lo suficientemente sensible para detectar diferencias, cuando estas no son muy aparentes.

No obstante, el principal hallazgo de este trabajo fué un notable decremento en la degradación de colágena en todos los pacientes estudiados. En contraste con estos resultados, un reporte previo del grupo de Gadek J.E. y cols. (32) sugiere que los pacientes con FPI presentan un aumento de colagenasa activa en el parénquima pulmonar. En dicho estudio, se analiza a la colagenasa presente en el líquido obtenido por lavado bronquioalveolar de 24 pacientes con FPI y 18 controles. La actividad de la enzima se determinó midiendo la cantidad de péptidos específicos - (TC^A y TC^B) que se liberaran de colágena tipo I soluble, -

marcada con prolina- $[^3\text{H}]$ sintetizada por fibroblastos pulmonares humanos en cultivo.

Con este ensayo, sus resultados mostraron que en 18 de los 24 pacientes con FPI pudo detectarse actividad colagenolítica en comparación con los controles, en los que no se detectó dicha actividad. Sin embargo, ese estudio adolece de varios defectos. Por ejemplo, no se establece una correlación entre el estadio de la enfermedad (temprana, intermedia o avanzada) y la presencia de actividad colagenolítica. Por otro lado, la colagenasa obtenida de lavados bronquioalveolares no es necesariamente un indicador de la cantidad de enzima presente en el intersticio pulmonar donde ocurre la fibrosis y finalmente, la proteína que se utilizó como sustrato, era colágena soluble, recién sintetizada por fibroblastos en cultivo, la cual no es representativa de las fibras insolubles y altamente complejas con las que se encuentra la enzima en el ambiente físico-químico local. En términos generales, estos hallazgos no reflejan al fenómeno intersticial como ocurre in vivo.

La degradación de colágena ha sido estudiada en el hígado cirrótico humano y de animales de laboratorio (30, 31) y los resultados son similares a los encontrados en este trabajo.

En los estadios avanzados de la fibrosis hepática, tanto experimental como humana, se ha observado una marcada

disminución de la actividad colagenolítica y este parece -- ser el caso en la fibrosis pulmonar idiopática. Hallazgos -- similares se han descrito en la esclerosis sistémica progre-- siva, una enfermedad humana caracterizada por incremento de colágena en la dermis y otros tejidos incluyendo pulmón. -- Brady A.H. (63), usando la misma técnica de Ryan y Woess-- ner que utilizamos en este estudio, encontró que en la piel de 7 de 12 pacientes con esclerosis, la actividad colageno-- lítica era mínima o estaba prácticamente ausente. Más aún -- en un mismo paciente, regiones dérmicas con marcada fibro-- sis no mostraban actividad enzimática mientras que áreas -- cutáneas clínicamente respetadas, exhibían niveles normales o casi normales de actividad colagenolítica.

Nuestros resultados sugieren que una situación simi-- lar ocurre en la FPI. En este padecimiento, la persistencia y progresión de la degradación de colágena que se traduce -- en un decremento de la tasa de recambio metabólico de esta proteína.

Como se ha mencionado previamente, la cantidad de -- colágena presente en el parénquima pulmonar en un momento -- dado, debe ser necesariamente el resultado de un equilibrio entre la síntesis y degradación de esta proteína y aunque -- la primera se encuentre dentro de límites normales en los -- estadios más avanzados de la enfermedad, una disminución en

la actividad colagenolítica puede explicar el depósito anormal de colágena en el intersticio pulmonar.

Sin embargo, la colagenolisis es un proceso muy complejo, regulado por múltiples mecanismos que sólo recientemente comienzan a ser aclarados.

Las colagenasas de mamíferos son un grupo diverso de enzimas hidrolíticas específicas (60-63), producidas por diferentes tipos celulares, incluyendo células inflamatorias, epiteliales y mesenquimatosas . La síntesis de la enzima puede verse afectada por numerosos factores estimuladores o inhibitorios (89) entre los que destacan linfocinas, macrocinas, prostaglandinas del tipo E y algunas hormonas. No obstante, la enzima se sintetiza en forma inactiva y debe ser apropiadamente activada para que pueda ejercer su acción. Entre estos activadores se han descrito a la plasmina, kalicreína y algunas proteasas séricas o provenientes de macrófagos y células cavadadas (90).

Por otro lado, la actividad de la enzima está controlada por la acción de diversos inhibidores específicos. El más conocido de ellos es la $\alpha 2$ -macroglobulina la cual se une a 2 moléculas de la enzima formando complejos " $\alpha 2$ -macroglobulina-colagenasa que son rápidamente removidos de los tejidos por los macrófagos.

También se ha descrito un inhibidor de bajo peso molecular, presente en concentraciones muy bajas en el plasma

ma, denominado B₁- anticolagenasa.

Más recientemente, se han descrito varios inhibidores con pesos moleculares entre 12,000 y 30,000 daltones, entre los que destacan algunas glucoproteínas catiónicas, el factor 4 plaquetario y un inhibidor presente en el líquido amniótico.

Finalmente, en condiciones fisiológicas, y principalmente en condiciones patológicas, la degradación de colágena depende de la susceptibilidad del sustrato in vivo (68).

Nuestros resultados demuestran en términos globales, una disminución de la actividad colagenolítica en FPI, pero esto puede deberse a una alteración en uno o varios de los múltiples mecanismos que regulan la actividad de la enzima.

En el futuro, será necesario profundizar en cada uno de ellos, desde la producción de pro-colagenasa por las células responsables hasta la acción de activadores e inhibidores locales e integrarlos a los mecanismos generales de control in vivo .

CONCLUSIONES:

1.- Los pacientes con FPI presentan un incremento en el contenido de colágena pulmonar.

2.- Los pacientes con FPI en estadios avanzados de la enfermedad no presentan cambios en la biosíntesis de colágena.

3.- En los pulmones de los pacientes con FPI se encuentra una disminución de la actividad colagenolítica, la cual puede ser responsable del mantenimiento de la fibrosis.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Crystal, R.G., Fulmer, J.D., Roberts, W.C., Moss, M.L., Line, P.R., Reynolds, H.Y. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical, histologic, radiographiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic and biochemical aspects. *Ann Intern Med.* 1976; 85: 769-88.
- 2.- Seyer, J.M., Hutcheson, E.T., Kang, A.L. Collagen polymorphism in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest* 1976; 57: 1498-1507.
- 3.- Cassan, S.M., Diviertie, M.D., Brow, A.L. Fine structural morphometry on biopsy specimens of human lung, 2, diffuse idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1974; 65: 275 - 278.
- 4.- Bignon, J., Hem, B., Molinier, B. Morphometric and angiographic studies in diffuse interstitial pulmonary fibrosis. *Prog. Respir Res* 1975; 8: 141-60.
- 5.- Bateman, E., Turner-Warwick, M., Adelman-Crill, B.C. Immunohistochemical study of collagen types in human foetal-lung and fibrotic lung disease. *Thorax* 1981; 36: 545-53.
- 6.- Karlinsky, J.B., Goldstein, R.H. Fibrotic lung disease in a perspective. *J. Lab Clin Med* 1980; 96: 939-42.
- 7.- Madri, J.A., Furthmayr, H. Collagen polymorphism in the lung. An immunohistochemical study of pulmonary fibrotic. *Human Path* 1980; 11: 353-65.
- 8.- Turner-Warwick, M., Burrows, B., Johnson, A. Cryptogenic fibrosing alveolitis: clinical features and their influence on survival. *Thorax* 1980; 35: 171-80.
- 9.- Crystal, R.G., Fulmer, J.D., Baum, B.J., Bradley, K.H., Bruel, S.D. et al. Cells, collagen and idiopathic pulmo-

- nary fibrosis. Lung 1978; 155: 199-224.
- 10.- Chvapil, M., Peng, Y.M. Oxygen and lung fibrosis. Arch Environ Health 1975;30:528-32.
 - 11.- Schaffner, F., Felig, P., Trachtenberg, E. Structure of rat lung after protracted oxygen breathing. Arch Pathol. 1967;83: 99-107..
 - 12.- Collins, J.F., Mc Cullough, B., Coalson, J.J., Johanson K.G. Bleomycin induced diffuse interstitial pulmonary - fibrosis in Baboons. Am Rev Respir Dis 1981;123:305-12.
 - 13.- Thrall, R.S., Mc Cormick, J.R., Jack, R.M., Reynolds, - R.A., Ward, P.A. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis - in the rat. Am J Pathol 1979;95:117-27.
 - 14.- Snider, G.L., Cello, B.R., Goldstein, R.H., O'Brien, J.J Lucey, E.C. Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamster by endotracheal bleomycin. Lung volu-- mes, volume-pressure relations, carbon monoxide uptake, and arterial blood gas studies. Am Rev Resp Dis 1978; 117:289-97.
 - 15.- Giri, S.N., Schwartz, L.W., Hollinger, M.A., Freywald, M.E., Schiedt, M.J., Zuckerman, J.E. Biochemical and - structural alterations of hamsters lungs in response - to intratracheal administration of bleomycin. Exp. Mol Path 1980;33:1-14.
 - 16.- Carvajal, R., Gonzalez, R., Vargas, F., Selman, M. Cellular mediated immunity against connective tissue in- experimental lung fibrosis. Lung 1982;160:131-40.
 - 17.- Vijeyaratnam, G.S., Corrin, B. Experimental paraquat poisoning; a histological and electron-optical study of changes in the lung. J. Pathol 1971; 103: 123-9.

- 18.- Sykes, B.I., Purchase, F.H., Smith, L.L. Pulmonary ultrastructure after oral and intravenous dosage of paraquat to rats. *J. Pathol* 1977;121:233-41.
- 19.- Greenberg, D.B., Reiser, K.M., Last, J.A. Correlation of biochemical and morphologic manifestation of acute pulmonary fibrosis in rats administered paraquat. *Chest* 1978;74: 421-5.
- 20.- Witschi, H., Haschek, W., Meyer, K.R., Ullrich, R.L., Dalbey, W.E. A pathogenic mechanism in lung fibrosis. *Chest* 1980;78:395-99.
- 21.- Haschek, W.M., Klein-Szants, A.J., Last, J.A., Reiser, K.M., Witschi, H. Long-term morphologic and biochemical features of experimentally induced lung fibrosis in the mouse. *Lab Invest* 1982;46:438-48.
- 22.- Hurych, J., Mirejovska, E., Koblir, V., Rencova, J. Enzyme changes during experimental silicotic fibrosis. I. peptidase and collagen deposition in the lungs. *Envir-Res* 1981; 25:424-33.
- 23.- Pickrell, J.A., Harris, D.V., Pflieger, R.C., Benjamin, S. A., Belasich, J.J., Jones, R.K., McClellan, R.C. Biological alterations resulting from chronic lung irradiation. II. Connective tissue alterations following inhalation of ¹⁴⁴Ce fused Clay aerosol in Beagle dogs, *Rad Res* 1975;63:299-309.
- 24.- Fulmer, J.D., Brokowski, R.S., Cowan, M.J., Breal, S.P., Bradley, K.M., Ferrans, V.J. et al. Collagen concentration and rates of synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1980;122; 289-301.
- 25.- Hamman, L., Rich, A.R. Fulminating diffuse interstitial fibrosis of the lungs. *Trans Am Clin Climatol Assoc*: 51:154-163.

- 26.- Crystal, R.G., et al. Interstitial lung disease: Current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am. J. - Med.* 1981;70: 542-568.
- 27.- Selman, M., Chapela, R., Montaña, M., Soto, H., Díaz, - L. Increased lung collagen content in diffuse pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1981;123:63.
- 28.- Selman, M., Chapela, R., Montaña, M., Soto, H., Díaz, L. Changes of collagen content in fibrotic lung diseases. *Arch Inv. Med. (Mex)* 1982;13:93-100.
- 29.- Okasaki, I., Maruyama, K. Collagenasa activity in experimental hepatic cirrhosis. *Nature.* 1974;252: 49-50.
- 30.- Monfort, I., Pérez Tamayo R. Collagenasa in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of de liver. *Am. J.- Path.* 1978;92:411.
- 31.- Pérez Tamayo R. Cirrhosis of the liver: A reversible - disease .In: SommersSC, Rosen OO, eds. *Pathology Annual Pat 2 Vol. 14.* Appleto-Century-Crafts,1979, pp183-213.
- 32.- Gadek, J.E., Kelman, J.A., Fells, G., Weinberger, S.E., Howtz, A.C., Reynolds, H., et al. Collagenase in the - lower respiratory tract of patients with idiopathic - pulmonary fibrosis. *N England J.Med.* 1979;301:737-42.
- 33.- Minor, R. Collagen metabolism. A comparison of diseases affecting collagen. *American Journal of Pathology.* 1980 98: (1):227-277.
- 34.- Woodhead-Galloway.J. Collagen:The Anatomy of a protein. (Edward Arnold,ed,) Camelot Press Ltd:1980.61 p.
- 35.- Miller, E.J. Biochemical and biological significance - of genetically distinct collagens. *Mol. Cell, Biochem.* 1976. 13 165-192.

- 36.- Oderman, E., Risteli, J., Van Delden, V., and Timpl, R., - Structural diversity and domain composition of a uni- - que collagenous fragment (intima collagen) obtained -- from human placenta. *Biochem J.* 1983;211:295-302.
- 37.- Hanne Bentz, Morris, N., Murray, L., Hollister, D. and - Burgeson, R. Isolation and partial characterization of - a new human collagen with an extended triple-helical -- structural domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983;80: 3168-3172.
- 38.- Sage, H., Balian, G., Vogel, A. and Bornstein, P. Type - VIII Collagen Synthesis by Normal and Malignant cells - in culture. *Lab. Invest.* 1984; 50(2):219-231.
- 39.- Bornstein, P., Structural distinct collagen types. *Ann- Rev. Biochem.* 1980;49:957-1003.
- 40.- Rennard, S.I., Ferrans, V.J., Bradley, K.H. and Crystal R.G. Lung connective tissue. In: *Mechanisms in Respira- tory toxicology, Vol. 2* (H Witchi. Ed) CRC Press, 1980.
- 41.- Seyer, J.M. Basement membrane associated collagens of - human lung. *Fed. Proc.* 37:1527. 1978.
- 42.- Bornstein P. and Traub, W. The chemistry and biology of collagen. In: *The proteins, Vol. 4* (H Neurath and R.L. - Hill Eds.), Academic Press, New York, 1979;412-632.
- 43.- Bradley, K.H., Kawanami, O., Ferrans, V.J. and Crystal, R.G. The fibroblase of human alveolar structures: a - differentiated cell with a major role in lung structure and function. In: *Methods in Cell. Biology, Vol 21* (C.C. Harris, B.F., Trump and G.D. Stomer, Eds.), Academic - Press, New York, 1980., p 37-64.
- 44.- Olsen, B.R. Posttranslational procesing and secretion - of procollagen in fibroblasts. *Proc. Br.Soc. Exp. Biol.*

1979;33:57-78.

- 45.- Blobel, G.H. Transfer of proteins across membranes. II Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell, Biol.* 1975 b, 67:852--862.
- 46.- Blobel, G.H. Extraction from free ribosomes of a factor mediating ribosome detachment from rough microsomes. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68:1-7 . 1976.
- 47.- Hance, A.J. and Crystal, R.G. The connective tissue of lung. *Am. Rev. Respir Dis.* 112: 657-771, 1975.
- 48.- Harris, E.D., Cartwright, E.C. Mammalian collagenases- In: *Proteinases in Mammalian Cells and tissues* (A.J. - Barret. Ed.) North Holland. Amsterdam 1977. p 249-284.
- 49.- Werb, Z. and Goedon, S. Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *J. - Exptl. Med.* 1975;142:361-377.
- 50.- Mainardi, C.L., Seyer, J.M., Kang, A.H. Type specific collagenolysis: a type V collagen-degrading enzyme from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980;97: - 1108-15.
- 51.- Gadek, J.E., Humminghake, C.W., Fells, G.A., Zimmerman, R.L. and Crystal, R.G. Production of connective tissue specific proteases by human alveolar macrophages is - - constitutive (Non-regulatable). *Am. Rev. Respir. Dis.* - 123 (suppl.): 55. 1981.
- 52.- Kelman, J., Brind, S., Hortwitz, A. Bradley, K., Hance, A., Breul, S., Baun, B. and Crystal R.G. Collagen synthesis and collagenase production by human lung fibroblast. *Am Rev. Respir. Dis.* 115 (suppl.):343. 1977.

- 53.- Horwitz, A.L., Hance, A.J. and Crystal, R.G. Granulocyte collagenase; selective digestion of type I relative to type III collagen. Proc. Natl. Acad. Sci (US) 74: 897-901. 1977.
- 54.- Horwitz, A.L., Kelman, J.A. and Crystal, R.G. Activation of alveolar macrophage collagenase by a neutral protease secreted by the same cell. Nature. 1976;264: 772-774.
- 55.- Rich, A.E., Seyer, J.M., Kang, H.A. and Mainardi, C.L. Identification of a type V collagen-degrading enzyme from human sputum. Am. Rev. Respir. Dis, 1983;128:166-169.
- 56.- Gadek, J.E., Fells, G.A., Wrigth, D.H. and Crystal R.G. Neutrophil elastase functions as a type III collagenase. Biochem, Biophys. Res. Commun. 1980;95:1815-1822.
- 57.- Rojkind, M., and González. E. An Improved method for determining specific radioactivities of proline-¹⁴C and hydroxyproline-¹⁴C in collagen and noncollagenous proteins. Anal Biochem, 1971. 57 (17):1-7.
- 58.- Phan, S.H., Thrall, R.S. The role of soluble factors in bleomycin induced pulmonary fibrosis. Am J. Pathol, 1981;106:156-64.
- 59.- Ryan, J.M., Woesner, J.F. Mammalian collagenase: direct demonstration in homogenates of involuting rat uterus. Bioch. Bioph. Res. Comm 1971;44:144-9.
- 60.- Hollinger, M.A., Zuckermann, J.E., Giri, S.M. Effect-acute and chronic paraquat on rat lung collagen content. Res. Comm. Chem. Path. Pharm 1978;21:295-305.
- 61.- Clark, J.G., Overton, J.E., Marino, B.A., Vitto, J., Starcher, B.C. Collagen biosynthesis in bleomycin-in-

- 62.- Kehrler, J.P. Collagen production rates following acute-lung damage induced by butylated hydroxytoluene. *Bioch Pharm.* 1982; 31:2953-58.
- 63.- Brady, A.H. Collagenase in Scleroderma. *J.Clin. Invest.* 1975; 56:1175-82.
- 64.- Hibbs, M.S., Mainardi, C.L. Kang, A.H. Type-specific-collagen degradation by eosinophils. *Biochem. J.* 1982;-207:621-24.
- 65.- Mainardi, C.L., Seyer, J.M., Kang, A.H. Type-specific -collagenolysis: A type V collagen--degrading enzyme from macrophages. *Bioch. Bioph. Res Comm.* 1980;97:1108--15.
- 66.- Horowitz, A.L., Hance, A.J., Crystal, R.G. Granulocyte collagenase : selective digestion of type I and type -III collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977;74:897--901
- 67.- Werb, Z., Gordon, S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 1975;142:346-60.
- 68.- Pérez Tamayo R, Monfort, I., Pardo, A. What controls -collagen resorption in vivo? *Med. Hypothesis.* 1980; 6: 711-26.
- 69.- Rojkind M,, Grambrone, M.A., Biempica, L. Collagen -types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterol.* -1979;76:710-19.
- 70.- Fleischmajer, R., Perlish, J.S., Duncan, M. Scleroderma. *Arch. Dermatol.* 1983;119:957-62.
- 71.- Cohan, K.I., Diegelman, R.F. The biology of keloid and hypertrophic scar and the influence of corticosteroids *Clin. Plast Surg.* 1977;4:279-99.
- 72.- Mimni, M.E. Collagen: structure, function and metabolism in normal and fibrotic tissues. *Seminars in Arthritis-*

and Rheumatism. 1983;13: 1-85.

- 73.- Barnes, H.J., Constable, B.J., Morton, L.F. Age related-variation in hydroxylation lysine and proline in collagen. *Biochem. J.* 1974;139:461-468.
- 74.- Thomas, P. Fibrosing alveolitis. *CMA Journal.* 1978;119: 1211-1216.
- 75.- Greenberg, D.H., Karen, R.M., Reiser, M.D., Last, A.J. Correlation of biochemical and morphologic manifestations of acute pulmonary fibrosis in rats administered paraquat. *Chest.* 1978; 74:421-425.
- 76.- Rose, M., Smith, L.L. The relevance of paraquat accumulation by tissue. In *Biochemical Mechanisms of paraquat toxicity* (Autor, A.P. ed.) Academic Press, Inc. New York:1977;71-90.
- 77.- Wilner, G.G., Nossel, H.L., LeRoy, E.C. Aggregation of platelets by collagen. *J.Clin. Invest.* 1968;47(2616): - 2616-2621.
- 78.- Wilner J.D., Nossel, H.L., LeRoy, E.C. Activation of Hageman by collagen. *J.Clin. Invest.* 1968;47:2608-2615.
- 79.- Chang, C., Houck, J.C. Demonstration of the chemotatic properties of collagen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1970. 134:22-26.
- 80.- Stack, B.H., Grant, W.B., Irvine, W.J. Idiopathic diffuse interstitial lung disease: a review of 42 cases. *Amer. Rev. Resp. Dis,* 1965;92:939-948.
- 81.- Fraser, R.G., Paré, J.A. Diagnostico de las enfermedades del torax. *Salvat España* 1973; 1062.
- 82.- Gadek, J.E., Fells, G.A., Zimmerman, R.L. and Crystal, R.G. Role of connective tissue proteases in the patho-

- genesis of chronic inflammatory lung disease. *Environmental Health Perspectives*. 1984;55:297-306.
- 83.- Krane, S. Collagen degradation. *Connective tissue Research*. 1982;10:51-59.
- 84.- Harris, E.D., Welgus, H.G. and Krane, S. Regulation of the mammalian collagenases. *Collagen Rel. Res.* 1984;4: 493-512.
- 85.- Rest, V.R. et al. The structure of type IX collagen. *J. Biol. Chem.* 1985.260 (1):220-225.
- 86.- Bruckmer, P., et al. Type IX collagen from sternal cartilage of chicken embryo contains covalently bound glycosaminoglycans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985;82:2608-2612.
- 87.- Schmid, T.M., Linsenmayer, T.F. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type IX) in avian tissues. *J. Cell. Biol.* 1985;100:598-605.
- 88.- Campbell, E.J., Harris, B., Avioli, L.V. Idiopathic - - pulmonary fibrosis. *Arch. Inter. Med.* 1981;141:771-774.
- 89.- Seyer, J.M. Mediators of increased collagen synthesis in fibrosing organs. *Fundamental and applied toxicology*, - 1985;5:228-239.
- 90.- Fritz, H., Proteinase inhibitors in severe inflammatory processes (septic shock and experimental endotoxaemia); biochemical, pathophysiological and therapeutic aspects in protein degradation in health and disease (Ed. Ciba-Foundation). *Excerpta Medica*, New York:351-379, 1980.