

00361

14-A
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS.

MODIFICACIONES ESTRUCTURALES Y BIOQUIMICAS EN
LA SILICOSIS PULMONAR EXPERIMENTAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

CARLOS RAMOS ABRAHAM.

MEXICO, D.F.

1987.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

CONTENIDO.

	PAGINA
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y METODOS	20
RESULTADOS	31
DISCUSION	58
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFIA	72

INTRODUCCION.

Desde hace varios siglos se conoce que la inhalación sostenida de concentraciones elevadas de sílice, causa en el hombre una enfermedad crónica, inflamatoria y fibrosante del pulmón, que se traduce clínicamente en una insuficiencia respiratoria crónica, progresiva, incapacitante y frecuentemente letal (1,2).

EL SILICE Y LAS CARACTERISTICAS DE EXPOSICION.

El sílice es el mineral más abundante de la corteza terrestre, donde se puede encontrar como sílice libre (silicio + oxígeno) o conjugado (silicio y oxígeno asociado con cationes como Mg, Al o Ca). La silicosis pulmonar es causada por partículas de sílice libre, el que químicamente es dióxido de silicio (SiO_2), estructurándose tetrahedricamente, con un átomo de silicio en su centro y un oxígeno en cada vértice, cada uno de estos últimos asociados a su vez con otro átomo de silicio para formar otro tetrahedro. En los diferentes minerales silíceos, la agregación de los tetrahedros determinará que el sílice sea cristalino o amorfo (2,3). Tanto in vivo (animales de laboratorio y humanos) como in vitro, la patogenicidad del sílice es tá determinada fundamentalmente por tres factores:

A) Se ha demostrado que las formas cristalinas del

sílice causan silicosis, mientras que las amorfas no la producen, a menos que hayan sido calcinadas (3); de las formas cristalinas las más fibrogénicas son el cuarzo y la tridimita que poseen cristales hexagonales y la cristobalita con cristales cúbicos, siendo en orden ascendente de fibrogenicidad : cuarzo, cristobalita y tridimita (3,4).

B) El tamaño de las partículas cristalinas se relaciona a su vez con el depósito de éstas dentro del pulmón; aquellas partículas menores de 5 μm son las que pueden depositarse en los alveolos (2,5,6). Tanto en humanos como en modelos experimentales la mayor acumulación ocurre en los lóbulos superiores, siendo de 1-2 μm el tamaño de las partículas más fibrogénicas (4,5).

C) La concentración de sílice en el polvo en conjunto con el tiempo de exposición determina el desarrollo de la silicosis en humanos y animales de laboratorio (2-4).

En el humano, el desarrollo de nódulos silicóticos con fibrosis es inducido por cuarzo y tridimita cuando un 18% del polvo de exposición es sílice y 20% en el caso de la rata (2,4). Es importante considerar que en el humano la silicosis se desarrolla por inhalación de concentraciones bajas de sílice por varios años, mientras que en los modelos animales se utilizan concentraciones altas en períodos cortos (3).

La historia del desarrollo industrial nos muestra

que con la introducción de maquinaria en las postrimerias del siglo XIX, en los procesos de extracción de minerales y a nivel agrícola hubo un aumento en el índice de silicosis, debido a que se incrementó la producción de polvos que contenían partículas de sílice menores de 10 μm , con alto porcentaje de aquellos menores de 5 μm (1).

Además de los factores ya citados es importante tomar en cuenta que la presencia ublcua del sílice en la corteza terrestre favorece el desarrollo de la silicosis en trabajadores que participan en los procesos de extracción , purificación y procesamiento de materiales extraídos de la misma y derivadas de ella (3).

Entre los procesos industriales que son fuente continua de exposición del trabajador a polvos conteniendo sílice libre, principalmente cuarzo y con alto riesgo del desarrollo de la silicosis se pueden mencionar las siguientes (3):

- Industria de abrasivos.
- Minería.
- Industria vidriera.
- Extracción y procesamiento de canteras.
- Construcción de túneles.
- Fundición.
- Alfarería.
- Forraje de ladrillos.

Purificación y procesamiento de rocas.

Albañilería.

Esta variedad de procesos hace de la silicosis una de las enfermedades ocupacionales más frecuentes (1,3).

PATOGENESIS DE LA SILICOSIS.

Una vez que las partículas de sílice han sido depositadas en los alveolos pulmonares y estando ya hidratadas, se forman grupos silanol en su superficie, siendo envueltos por proteínas del medio alveolar. Posteriormente estas partículas son fagocitadas por los macrófagos, los cuales fusionan el fagosoma resultante de la fagocitosis con un lisosoma primario, formándose un fagolisosoma. En el interior de este, las enzimas hidrolizan a las proteínas dejando descubiertos los cristales de sílice, al cual no degradan; las moléculas de silanol interaccionan formando complejos con fosfolípidos y proteínas (5,7), produciendo la desestabilización de la membrana fagolisosomal hasta que ésta se rompe. Esto permite la liberación de enzimas lisosomales y de los cristales de sílice, además de radicales libres de oxígeno, como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidróxido (OH^-) los que peroxidan lípidos de membranas celulares y proteínas, aumentando la citotoxicidad (8,9). Por otro lado, los cristales de sílice liberados en el exterior son fagocitados nuevamente, repitiéndose los mismos

eventos (2,3,5,6,10). Estos fenómenos desencadenan el proceso inflamatorio, iniciado por los macrófagos alveolares y continuando por otras células (monocitos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares que migran hacia el intersticio y los alveolos pulmonares) desarrollando la inflamación (alveolitis) (11,12,13,14). La acumulación de estas células ocurre preferencialmente en áreas perivasculares y peribronquiales (12), siendo éstos los sitios en los que se desencadena el proceso inflamatorio que tiene como resultado la formación de nódulos (granulomas) silicóticos (14). Estos nódulos en humanos y modelos animales se conocen como incipientes al principio de su desarrollo donde son básicamente celulares. Con el tiempo, éstos granulomas se van transformando en nódulos silicóticos maduros (hialinos), los cuales contienen menos células y gran cantidad de colágena y exhiben comúnmente 3 zonas principales: la más interna, que consiste de tejido conjuntivo hialino con un arreglo espiralado, la zona intermedia con fibras de colágena dispuestas concéntricamente y la zona más externa con un alto contenido de macrófagos entremezclados con fibras de reticulina (la que más comúnmente es colágena tipo III) (15) y fibroblastos (2,16).

También se ha observado la hiperplasia de los neumocitos tipo II, estas células fagocitan al sílice, pudiendo ser una posible vía de traslocación del cristal hacia el in-

tersticio alveolar, asimismo los neumocitos tipo I también fagocitan cristales de sílice. Sin embargo, el cristal es tóxico para estas células a las que destruye, produciendo la cuboidalización del epitelio alveolar (13,14).

Durante el desarrollo de la silicosis en animales de laboratorio ocurren diversos cambios bioquímicos. Por ejemplo, con dosis superiores a 10 mg de sílice instilado (inyección intratraqueal del sílice), se observa desde las primeras 24 horas aumento en la cantidad de ADN, proteínas no-colagénicas y lípidos. El contenido de colágena se incrementa alrededor de los 7 días de la instilación (17) y permanece así durante el resto de la vida del animal. Además se alteran diversas enzimas del metabolismo energético. En este sentido se ha observado un aumento en la actividad de la lactatodeshidrogenasa, la triosa fosfato deshidrogenasa y la hexocinasa, junto con una disminución en la actividad de la glicerol-3-fosfato NADdeshidrogenasa y la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, lo que indica aumento en el metabolismo anaeróbico con producción de lactato sin alteración del metabolismo aeróbico ya que la citrato sintetasa y la malato deshidrogenasa no cambian su actividad en ratas silicóticas (18). Por otro lado, también ha sido comunicado un aumento en el contenido de surfactante alveolar en animales instilados con sílice (1,2).

FIBROGENESIS.

En algún momento de la evolución del padecimiento, se produce en el pulmón una alteración en el metabolismo de la colágena que causa la acumulación de esta proteína en el interior de los nódulos silicóticos y en el intersticio pulmonar (2-4). Se ha investigado la participación de los macrófagos pulmonares y se conoce que estas células en cultivo estimuladas con sílice liberan un factor que induce la síntesis de colágena cuando se agrega a cultivos de fibroblastos (19); este factor es una proteína básica de 143,000 daltones, y se ha sugerido que actúa estabilizando el ARNm de diversas proteínas, principalmente de colágena incrementando su síntesis (20).

En diversos modelos animales utilizando cantidades variables de sílice, se ha demostrado incremento en la cantidad de colágena pulmonar, con aumento en la síntesis de esta proteína desde las 24 horas de la instilación del mineral (17). Como ya se mencionó, éste aumento en el contenido de colágena se mantiene de manera irreversible en animales de laboratorio, así como en el caso de pacientes con la enfermedad.

LAS COLAGENAS.

El parénquima pulmonar se encuentra constituido por diversos tipos de células y una matriz extracelular for

mada principalmente de colágenas, fibras elásticas, proteoglicanos y fibronectina (21); de estos componentes las colágenas son las más abundantes y representan del 10 al 15% del peso seco pulmonar del humano adulto (22).

En el parénquima pulmonar se conoce la presencia de las colágenas tipo I, III, IV y V; los tipos I y III constituyen el 95% del contenido de colágena pulmonar, con una proporción de 3:1 en favor de la tipo I, el 5% restante comprende a los tipos IV y V.

Cada molécula de colágena se forma mediante la asociación de 3 cadenas denominadas α , específicas para cada tipo de colágena, las cuales conforman una estructura semejante al de una varilla cilíndrica rígida; algunos tipos de colágenas poseen regiones globulares (no colagénicas) (tabla I); cada cadena α presenta una estructura primaria ($\text{Gli-X-Y})_n$; la presencia de la glicina cada 3 residuos es fundamental para el ensamblaje de la triple hélice (23).

Por otro lado los iminoácidos prolina e hidroxiprolina constituyen en general el 20-25% de los residuos de aminoácidos de cada molécula de colágena. Los residuos de hidroxiprolina estabilizan a la triple hélice, interaccionando a través de agua con otra hidroxiprolina (23).

En la posición Y de las cadenas α se localizan residuos de 4-hidroxiprolina o de otro aminoácido y en la posición X residuos de prolina o de 3-hidroxiprolina (prin-

TABLA 1. TIPOS DE COLAGENA EN MAMIFEROS, CARACTERISTICAS Y DISTRIBUCION TISULAR (23-32).

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 gli- cosilada.	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 pulmonares. Contiene 3- hidroxipro- lina.	Membranas- basales, - glicosilada, alvéolos - pulmonares. globulares.
V	αA	104,000	$[\alpha A]_3$ $[\alpha B]_3$ $\alpha A \alpha B$	Similar a ti- po IV	Membranas- basales, - pulmón, - placenta
	αB	99,000			

CONTINUACION DE LA TABLA 1.

TIPO	CADENAS POLIPEPTIDICAS	PM APARENTE (daltones)	CARACTERIS TICAS	DISTRIBUCION EN TEJIDOS.
VI	Tipo A	50,000- 70,000 cada una	Alta en hidro- xilisina menor contenido de - hidroxiprolina y de glicina - que en otras -	Membrana ba- sal de endo- telios de - placenta, ri- ñón y aorta humana.
Colágena Intima	SC2 SC2 SC3		colágenas, con una región glo- bular no cola- génica en cada extremo, unidas por puentes di- sulfuro.	
	Tipo B	50,000- 70,000 cada una		
	Acida Acida Básica			
VII	LC	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-hidroxipro- lina.	Membranas co- rioamnióticas, placenta y -- cartílago neó- natal humano.
Colágena de cadena larga o IC	LC LC LC			
VIII	EC ₁	177,000	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.
Colágena Endotelial o EC.	EC ₂ EC ₃	125,00 100,000		

CONTINUACION DE LA TABLA 1.

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 en hueso durante la osificación.

principalmente en colágenas tipo IV y V) o bien otro aminoácido (24). Es también importante la presencia de residuos de 5-hidroxilisina, la cual junto con los residuos de lisina juegan un papel importante en la formación de enlaces covalentes entre las diferentes moléculas de colágena que constituyen las fibras de esta proteína, además de ser el sitio de glucosilación.

Actualmente se conocen por lo menos 10 tipos genéticamente distintos de colágena en mamíferos, las cuales se ubican en zonas y tejidos específicos (tabla I) (23,25-32).

BIOSINTESIS DE LAS COLAGENAS.

Este proceso puede ser dividido en 2 fases :

A) Eventos intracelulares requeridos para sintetizar y secretar las moléculas de procolágena (precursores) y

B) Eventos extracelulares para convertir a la molécula de procolágena en colágena y ensamblarla para formar fibras (23).

A) Eventos intracelulares.

Inicialmente los genes específicos de los ARNm para las cadenas de preprocolágena (prepro- α) son transcritos, procesados y transportados hacia los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico rugoso (RER). Aquí son traducidos para formar las cadenas prepro- α (33); una

vez que la cadena prepro- α naciente migra a las cisternas del RER es hidrolizada una secuencia de alrededor de 100 residuos de aminoácidos (el péptido señal) por una peptidasa específica (34), dando como resultado una molécula llamada pro- α la cual tiene un peso molecular de alrededor de 150,000. Durante la migración al RER se inician las modificaciones postraduccionales de las moléculas pro- α libres. Estas se inician con la hidroxilación de residuos específicos de prolina y lisina. Posteriormente se glucosilan ciertos residuos de hidroxilisina, formando residuos de galactosilhidroxilisil y glucosil-galactosil-hidroxilisil. Después se forman puentes disulfuro intercadena en las regiones amino terminales e intercadena e intracadena en las regiones carboxilo terminales, para que finalmente se integre la triple hélice de las moléculas de procolágena (23,33). Posteriormente estas moléculas son secretadas por vacuolas derivadas del aparato de Golgi en asociación con el citoesqueleto y ATP-Mg²⁺.

B) Eventos extracelulares.

Una vez secretadas al espacio extracelular las moléculas de procolágena son convertidas a moléculas de colágena, al perder los propéptidos terminales por la acción de la procolágena aminopeptidasa y la procolágena carboxipeptidasa. La molécula de colágena resultante tiene un peso molecular de alrededor de 300,000 (la colágena tipo

IV no pierde los propéptidos amino y carboxilo terminales). Finalmente las moléculas de colágena son convertidas a fibras específicas mediante reacciones de condensación aldólica; para esto, diversos grupos β - amino de ciertos residuos de lisina e hidroxilisina son convertidos a aldehídos (residuos aldehídicos de lisina y de hidroxilisina), mediante reacciones de desaminación oxidativa; estos aldehídos reaccionan con otros residuos de lisina o hidroxilisina, formándose una base de Schiff, la cual se rearregla formando un enlace covalente, aldol, hidroxialdol o cetoimina (23,33).

DEGRADACION DE LAS COLAGENAS.

Es importante el entendimiento de los mecanismos de la degradación de las colágenas, ya que el recambio metabólico de estas proteínas durante los procesos inflamatorios y fibrogénicos pueden ser uno de los mecanismos moleculares principalmente involucrados en el desarrollo de la fibrosis pulmonar (15).

Las colágenas de mamíferos en su estado nativo y en forma soluble (como tropocolágena) son hidrolizadas por las colagenasas; esto requiere de la acción previa de un grupo de enzimas que liberan a la colágena de su interacción con otras moléculas de la matriz extracelular (elastina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos entre otros) y

la despolimerizan de las fibras hasta colágena soluble (35), la cual es hidrolizada por la colagenasa para producir fragmentos de colágena. Estos fragmentos se desnaturalizan a la temperatura corporal, para ser hidrolizados por otras proteasas (36), tales como gelatinasas (37), peptidasa PZ, pepsina, tripsina, elastina y catepsinas (36).

Las colágenasas son un grupo de metaloproteinasas dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+} para su catálisis : el pH óptimo para su acción es de 7.5 - 8.5, y prácticamente no tienen actividad en pH inferior a 5 . Su temperatura óptima es de 37°C y presentan una alta especificidad por colágena nativa. Son inhibidas por agentes quelantes tales como EDTA y 1, 10-orto fenantrolina, y por compuestos con grupos sulfhidrilo reactivos, como cisteína, ditioneitol y D-penicilamina (1-10 mM) (35).

El mecanismo de acción de las colagenasas de mamíferos al menos para colágenas I, II y III implica la ruptura de la colágena nativa y soluble en 2 fragmentos, TC^{A} y TC^{B} ; el primero comprende el 75% de los residuos de aminoácidos de la molécula abarcando el segmento amino terminal y el segundo el 25% restante con el carboxilo terminal (36, 38); la ruptura ocurre entre los residuos -Gli-Ile-Ala ó Gli-Leu-Ala, de modo que la estructura primaria de la molécula de colágena es uno de los factores que controlan la degrada-

ción (39).

En las células humanas, las colagenasas se sintetizan como procolagenasa, aunque pueden ser secretadas como procolagenasa (zimógeno inactivo) o como colagenasa activa. La procolagenasa debe ser convertida en la enzima activa por proteólisis, tal como ocurre con la enzima de macrófagos alveolares del conejo (36), o bien por un mecanismo no proteolítico como en el caso de la enzima secretada por los fibroblastos de la piel humana (40).

En el pulmón se conocen como fuentes de colagenasa a los macrófagos alveolares (41,42), fibroblastos (43) y neutrófilos (44), en los tres casos la enzima es secretada como procolagenasa en respuesta a diversos estímulos (41,44,45,46).

Las colagenasas de macrófagos y fibroblastos degradan de manera similar a las colágenas tipo I y III, mientras que la colagenasa de neutrófilos degrada preferentemente a la colágena tipo I (15,38).

Se ha descrito una colagenasa aislada del esputo de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, la cual degrada colágena tipo V (47).

REGULACION DE LA ACTIVIDAD COLAGENOLITICA.

La colagenólisis (hidrólisis de colágena por cola-

genasa), se encuentra regulada por diversas moléculas, involucradas en varios eventos que van desde la transcripción de los ARNm para los zimógenos de la colagenasa (procolagenasa) hasta la inhibición y activación de la enzima activa en los tejidos (36,40,48).

El primero de los mecanismos regulatorios ocurre a nivel de la biosíntesis de los zimógenos de la colagenasa; en este evento se conocen diversas moléculas que activan su biosíntesis, tales como : linfocinas, macrocinas, diversas proteínas, prostaglandinas E₁ y colágena soluble entre otras; también existen moléculas inhibitorias de la biosíntesis, como por ejemplo los glucocorticoides, estrógenos, progesterona, indometacina y otros (40,49).

El siguiente evento regulatorio se encuentra a nivel del empaquetamiento y la secreción de los zimógenos de la colagenasa; agentes farmacológicos como la citocalasina B y la colchicina, inducen la secreción de los zimógenos de la colagenasa por interacción con proteínas del citoesqueleto. Este fenómeno resulta controversial para el caso de la colchicina, ya que se ha demostrado que esta droga inhibe la secreción en una amplia variedad de sistemas (50). Sin embargo, el mecanismo por el cual la colchicina estimula la secreción de los zimógenos de la colagenasa se desconoce (51,52). En cambio el ácido retinoico y sus derivados inhiben su secreción (36).

Un tercer evento regulatorio se encuentra en la activación de los zimógenos de la colagenasa para su conversión en la enzima activa; agentes tales como la plasmina, kalicreína, catepsina-B, 4-cloromercurobenzoato y yoduro de sodio entre otros, inducen dicho cambio (36).

Un cuarto evento lo constituye la interacción de colágena con la colagenasa activa, ya que se requiere de un exceso de sustrato para la catálisis, aunque ésta depende también del grado de agregación de la colágena (40).

Se puede citar como quinto evento regulatorio la inhibición de la colagenasa activa. Esta inhibición ocurre por la unión a diversos inhibidores, los que habitualmente se encuentran en el suero y los tejidos; los mejor descritos son la α_2 -macroglobulina, la B_1 -anticolagenasa, algunos inhibidores de metaloproteinasas y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP), todos los cuales forman complejos con la colagenasa activa (36,40,48).

OBJETIVOS.

El presente trabajo fué realizado con la finalidad de contribuir al entendimiento de los mecanismos que inducen y perpetúan el proceso fibrogénico durante la silicosis pulmonar. Para esto, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Reproducir un modelo experimental de silicosis pulmonar en ratas, con lesiones estructurales semejantes a la silicosis pulmonar humana.

2. Analizar de manera secuencial, en los tiempos de 7, 15, 30, 45 y 60 días los cambios que ocurren a nivel del metabolismo de las colágenas pulmonares, a partir de una sola instilación (inyección intratraqueal) de 35 mg de sílice en ratas.

3. Analizar los cambios producidos sobre la biosíntesis y degradación de la colágena en tejido pulmonar normal de rata, por sobrenadantes obtenidos de homogenados de pulmones silicóticos de rata.

Para cumplir con estos objetivos se desarrolló la metodología que se detalla a continuación.

MATERIAL Y METODOS.

PARTE A

DESARROLLO DEL MODELO.

Ratas Wistar macho de 8-9 semanas de edad con pesos de 180-200 g, fueron instiladas por vía intratraqueal (inyección a través de los músculos intratraqueales) con 35 mg de sílice (cuarzo DQ-12; donado por el Instituto de Medicina Ocupacional de Edinburgo; partículas menores de 5 μm) resuspendidos en un volumen final de 0.5 ml de solución de NaCl 0.15 M esteril.

Las ratas control recibieron por la misma vía 0.5 ml de solución salina fisiológica esteril (NaCl 0.15 M).

Después de 7,15,30,45 y 60 días fueron sacrificadas 8 ratas instiladas con sílice y 4-5 ratas control.

ESTUDIO MORFOLOGICO.

Para este estudio se utilizó el pulmón derecho, el cual fué perfundido después de haber ligado el hilio izquierdo. La perfusión se llevó a cabo mediante una cánula introducida a través de la traquea, con una solución de glutaraldehído al 2% y formaldehído al 4% amortiguada con fosfatos a pH 7.4.

Para el estudio de microscopía de luz, los tejidos fueron enbebidos en parafina, cortados en porciones de 4 μm

de espesor, los cuales fueron desparafinados e hidratados con alcoholes graduales hasta agua. Algunos cortes fueron teñidos con hematoxilina -eosina, otros con la tinción tri-crómica de Massón (53) y algunos más con la tinción del rojo de sirio (54). Posteriormente los cortes ya teñidos se deshidrataron con alcoholes graduales hasta etanol absoluto, se aclararon con xilol y se montaron para observarlos y fotografiarlos en un fotomicroscopio Zeiss (fotomicroscopio III, Carl Zeiss, Mod. 492106).

Para el estudio de microscopia electrónica los tejidos fueron postfijados con tetróxido de osmio al 1%, embebidos en resina epoxi (Epón-812), cortados y contrastados con acetato de uranilo. Se observaron con un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM-10).

MICROANÁLISIS DE RAYOS X.

Para este estudio se utilizaron cortes de tejidos embebidos en parafina, los cuales fueron colocados sobre discos de carbón, para ser observados con un microscopio electrónico de barrido (JEOL 35-C). A éste microscopio se conectó un analizador de rayos X (Kevex) que detectó los rayos X emitidos por los átomos de silicio (Si) de los granulomas de pulmones instilados con sílice y de los pulmones normales de rata.

ESTUDIO BIOQUIMICO.

Se utilizó el pulmón izquierdo, el cual fué obtenido en fresco.

CUANTIFICACION DE COLAGENA.

Fragmentos de pulmón fueron deshidratados en estufa (Thelco). Posteriormente alrededor de 20 mg de peso seco fueron hidrolizados con HCl 6 N, dentro de una ampolleta de vidrio sellada al vacío, a 100° C por 24 horas, filtrados , evaporados a sequedad y resuspendidos en agua bi-distilada, para finalmente tomar alícuotas y evaluar por triplicado la hidroxiprolina, iminoácido casi exclusivo de las colágenas .

La cuantificación de la hidroxiprolina se realizó utilizando el método de Rojkind y González (55), el cual consiste en oxidar las muestras con cloramina T, deteniendo dicha oxidación a los 30 minutos con tiosulfato de sodio 2 N; posteriormente se adicionó hidroxido de sodio 1 M y 2 g de cloruro de sodio para aumentar la extracción del producto oxidado. Después de someter las muestras a ebullición por 30 minutos, con el objeto de que la hidroxiprolina se convirtiera a su forma pirrólica, para extraerla posteriormente en tolueno por agitación.

El anillo pirrólico se sometió a reacción con el reactivo de Ehrlich (5 g de p-dimetilaminobenzaldehido,

para 90 ml de etanol absoluto y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado). Después de 30 minutos a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro (Beckman , modelo 25).

Los resultados fueron expresados como concentración en mg de colágena/gramo de tejido seco y como contenido en mg de colágena/pulmón.

BIOSINTESIS DE COLAGENA.

Fragmentos de 100-200 mg de tejido pulmonar fresco fueron incubados durante 4 horas en 3 ml de medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle, al cual se le adicionó 210 µg de sulfato ferroso, 60 µg de ácido ascórbico, 900 µg de glutamina, 300 U de penicilina, 300 U de Estreptomina y 300 U de kanamicina, además de suero fetal de ternera al 10%.

Los cultivos fueron preincubados por 1 hora a 37° C en un incubador (Lab-line Instruments, Inc.) que contenía una mezcla gaseosa de 95% de O₂-5% de CO₂. Después de preincubar por 1 hora, el medio de cultivo fué reemplazado por 3 ml de medio fresco que contenía además de las sustancias mencionadas, 30 µCi de (2,3-³H)-prolina (32.2 Ci/mol, New England Nuclear, Boston, Mass.) y se incubó durante 4 horas. Después del período de incubación, cada muestra se homogenizó con un homogenizador de tejidos Poly

trón (Brinkman Instruments, Inc., Westbury, N.Y.), añadiendo 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, lavando posteriormente 3 veces con TCA al 5% con el objeto de precipitar proteínas y separar la prolina-³H libre (56).

El material precipitado fué hidrolizado con HCl 6 N en una ampolleta de vidrio sellada al vacío, a 100° C por 24 horas en estufa (Thelco).

El hidrolizado se filtró, evaporó y resuspendió en agua bidestilada (pH 7). De aquí se tomaron alícuotas para evaluar la incorporación de prolina-³H como un índice de síntesis de proteínas totales y la incorporación de hidroxiprolina -³H como el índice de síntesis de colágena, utilizando el método de Rojkind y González (55).

Las alícuotas fueron sometidas a oxidación con cloramina T, deteniendo la reacción con tiosulfato de sodio 2M, posteriormente se adicionó hidroxido de sodio 1 M y 2 g de cloruro de sodio para aumentar la extracción del producto oxidado.

La extracción de la prolina-³H oxidada se realizó adicionando tolueno y agitando enérgicamente durante 30 segundos.

La radiactividad se determinó con el líquido de centelleo tolueno -POPOP (2,2-p-fenilenbis-5-feniloxazol) (57) en un contador de centelleo líquido (Beckman LC-100 C).

Después de extraer la prolina-³H con tolueno, se lavó 3 veces con tolueno para eliminar el remanente de éste iminoácido.

La hidroxiprolina -³H que quedó en la fase inorgánica de la muestra, se sometió a ebullición por 30 minutos y así oxidarla a la forma pirrólica, su extracción y determinación de radiactividad se realizó de la misma forma descrita para la prolina-³H.

Los resultados de la biosíntesis se expresaron de 2 maneras:

a) como % de síntesis de colágena respecto a proteínas totales; para este efecto se utilizó la fórmula de Phan (58), que multiplica las cuentas por minuto de prolina por un factor de 5.04 que corrige el contenido más bajo de prolina de las proteínas no colagénicas, de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\begin{array}{l} \text{\% de Síntesis} \\ \text{de colágena} \end{array} = \frac{2 \text{ cpm OH-prolina}}{2 \text{ cpm OH-prolina} + [5.04 (\text{cpm prolina})]} \times 100$$

b) como incorporación de cpm de hidroxiprolina-³H/pulmón.

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA.

Para evaluar la actividad colagenolítica se utilizó el método de Ryan y Woessner modificado (59). Este méto-

do permite evaluar la hidrólisis de las colágenas presentes en el pulmón por la colagenasa presente en el mismo órgano, sin la adición externa de colágena ni de colagenasa.

Fragmentos de aproximadamente 500 mg de tejido pulmonar fresco, se homogenizaron en un homogenizador de tejidos Polytrón (Brinkman Instruments, Inc, Westbury, N.Y.) en una solución amortiguadora de Tris- HCl 0.1 M pH 7.8 .

El homogenado fué dividido para obtener 6 alícuotas, las cuales a su vez se separaron en 2 grupos. El primero de ellos (3 alícuotas) se incubó en un baño metabólico con agitación durante 24 horas a 37° C, conteniendo amortiguador Tris-HCl 0.05 M pH 7.4, NaCl 0.15 M y CaCl₂ 0.005 M. En estas 3 muestras se evaluó la actividad colagenolítica; las otras 3 muestras se incubaron en las mismas condiciones, pero adicionando EDTA 0.05 M, el cual es un agente quelante del calcio, por lo que inhibe a la colagenasa y nos indica una degradación basal (control).

24 horas después de la incubación, la reacción se detuvo adicionando 0.1 ml de EDTA 0.05 M a las muestras que no lo contenían y para igualar los volúmenes se adicionó 0.1 ml de amortiguador Tris HCl 0.05 M pH 7.4 a las muestras que de inicio contenían EDTA.

Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 6,000 rpm a 4° C. El precipitado se utilizó para evaluar la cantidad de colágena incubada, empleando el método de Roj-

kind y González (55).

El sobrenadante se filtró a través de una membrana con un límite de exclusión máximo de 100,000 daltones (Diaflo XM-100, Amicon Corp., Lexington, Mass), con la finalidad de que solamente los fragmentos de colágena menores que las cadenas α fueran colectados.

Una vez que se obtuvo el filtrado se evaluó el contenido de colágena degradada, con el método de Rojkind y González (55), descrito anteriormente.

Después de restar la degradación basal obtenida en las alícuotas con EDTA, los resultados se expresaron como:

μg de colágena degradada/mg de colágena incubada
en 24 horas.

PARTE B

EFFECTO DE FACTORES SOLUBLES OBTENIDOS DE PULMONES DE RATAS SILICOTICAS SOBRE EL METABOLISMO DE COLAGENA EN PULMONES DE RATAS NORMALES.

Se utilizaron 11 ratas silicóticas, después de 2 meses de la instilación de 35 mg de sílice (DQ-12) y 11 ratas control.

Los pulmones fueron lavados in situ con PBS estéril a través del ventrículo derecho, para posteriormente extraer los pulmones y homogenizarlos en un homogenizador de tejidos Polytrón en PBS estéril.

Los pulmones homogenados fueron centrifugados a 19,000 rpm por 60 minutos para obtener el sobrenadante, el que fué esterilizado por filtración en filtros de 0.45 μ . Los sobrenadantes se congelaron a -20° C hasta su uso.

BIOSINTESIS.

Se realizó igual que en la parte A, sólomente que los explantes de pulmón se cultivaron en presencia de:

a) 0.5, 1.0 y 2.0 ml de PBS; b) 0.5, 1.0 y 2.0 ml de sobrenadante de pulmón normal (SPN) y; c) 0.5, 1.0 y 2.0 ml de sobrenadante de pulmón silicótico (SPS).

DEGRADACION

Fu  realizada con el mismo ensayo de la parte A, pero en este caso los homogenados de pulmón normal de rata se incubaron con :

a) 0.1 y 0.5 ml de PBS; b) 0.1 y 0.5 ml de SPN y c) 0.1 y 0.5 ml de SPS.

ANALISIS ESTADISTICO .

Para cada variable estudiada se obtuvo la media y la desviación estándar de los datos obtenidos en los controles y el grupo experimental.

Se utilizó la prueba t de Student y las $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS .

PARTE A

ESTUDIO MORFOLOGICO.

Al analizar los pulmones de las ratas instiladas con sílice, se observó la presencia de nódulos (granulomas) silicóticos, localizados preferentemente en áreas perivasculares y peribronquiales, los cuales median entre 50 y 500 μm de diámetro. En los animales sacrificados a los 7 y 15 días de la instilación, los nódulos fueron en su mayoría incipientes; mostraron un alto grado de celularidad con escaso depósito de colágena. Además se apreciaron grados variables de lipoproteinosis alveolar (figs. 1 y 2).

En los pulmones de ratas sacrificadas a los 30, 45 y 60 días de la instilación, los granulomas mostraron un incremento en el depósito de fibras de colágena y escasa celularidad; algunos de ellos estaban incluso hialinizados y las técnicas de tinción del rojo de sirio y tricrómica de Masson, que permiten la visualización de la colágena, corroboraron la presencia de haces de esta proteína con grosores variables los que se localizaban en el interior de los nódulos silicóticos (fig. 3).

El estudio de microscopía electrónica, demostró la presencia de los cristales de sílice en el interior de los

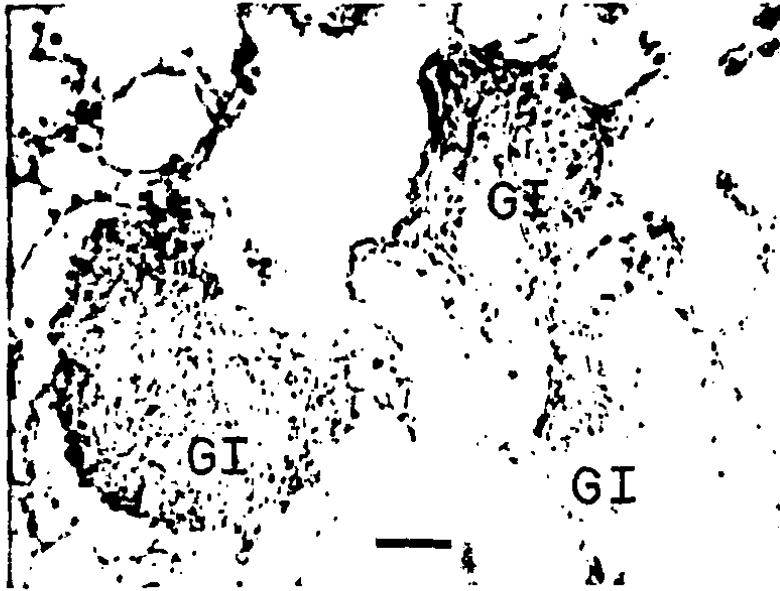


Figura 1. Fotomicrografía de pulmón de rata después de 15 días de la instilación de 35 mg de sílice. Se observan 2 granulomas incipientes (GI), mostrando alto grado de celularidad. Hematoxilina y eosina. 250X
Barra = 100 μ m.

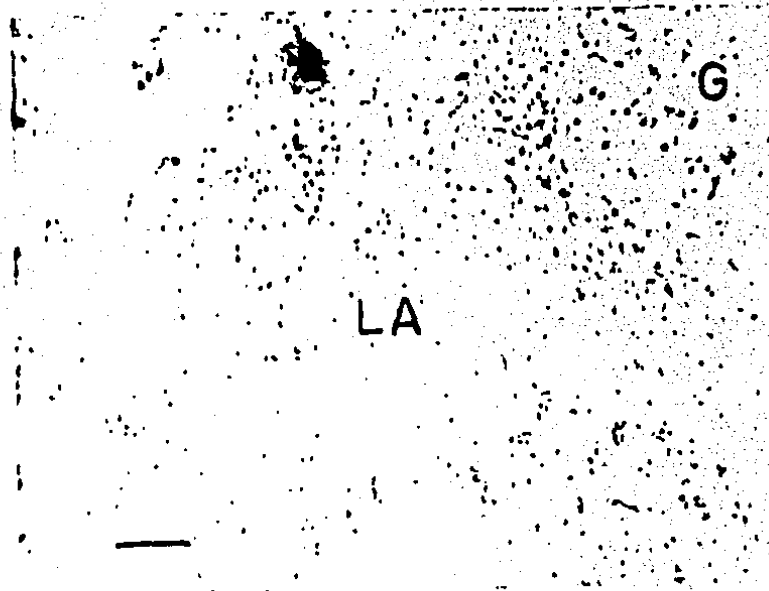


Figura 2. Fotomicrografía de pulmón de rata después de 15 días de la instilación de 35 mg de sílice. Se observa parte de un granuloma (G), así como lipoproteínosis alveolar (LA). Hematoxilina y eosina. 250X.

Barra = 100 μ m.

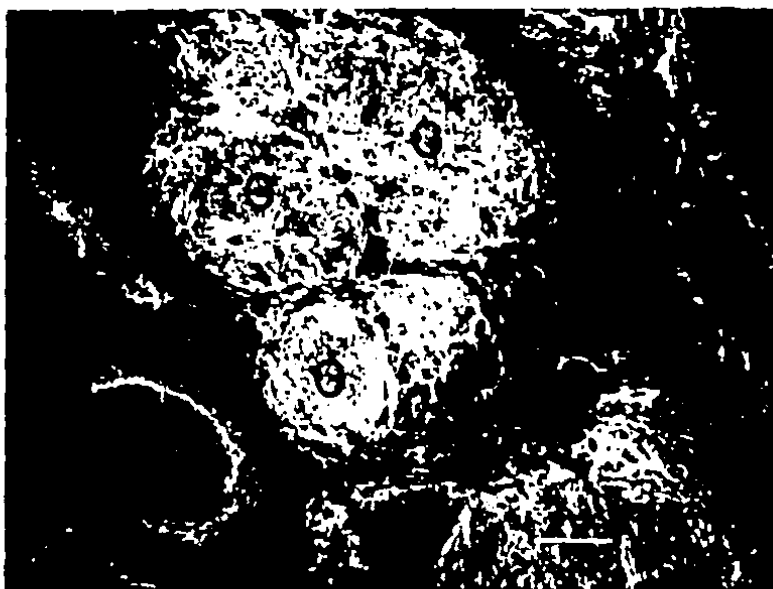


Figura 3. Fotomicrografía de pulmón de rata después de 45 días de la instilación de 35 mg de sílice. Se observan varios granulomas (G), en los que la colágena ha sido teñida con rojo de sirio observandose con luz polarizada. Rojo de sirio. 250X.

Barra = 100 μ m.

macrófagos en el granuloma, así como la presencia de fibras de colágena alrededor de las células mononucleares (fig. 4).

Con la técnica de microanálisis de rayos X se corroboró la presencia de los cristales de sílice en el interior de los granulomas (fig. 5 a y b).

PESO HUMEDO Y PESO SECO.

El peso húmedo y el peso seco de los pulmones de los animales sacrificados a los 15, 30, 45 y 60 días de la instilación mostraron aumentos significativos al compararlos con los pesos de los pulmones de ratas normales ($p < 0.01$ a los 15, 30 y 45 días y $p < 0.001$ a los 60 días en peso húmedo; $p < 0.01$ a los 15 y 30 días y $p < 0.001$ a los 45 y 60 días en peso seco) (tablas 2 y 3; figs. 6, 7). Por otra parte no se encontraron diferencias en el contenido de agua en los pulmones instilados con sílice al compararlos con los pulmones normales. Siendo alrededor del 80% el contenido de agua de ambos pulmones.

CONCENTRACION Y CONTENIDO DE COLAGENA.

Al expresar la cantidad de colágena como concentración (mg de colágena/g de tejido seco) se encontró que los pulmones de las ratas sacrificadas a los 30 y 45 días mostraron un aumento significativo de esta proteína ($p < 0.05$); sin embargo, en los pulmones de las ratas sacrificadas en los tiempos previos y a los 60 días no hubo diferencias sig

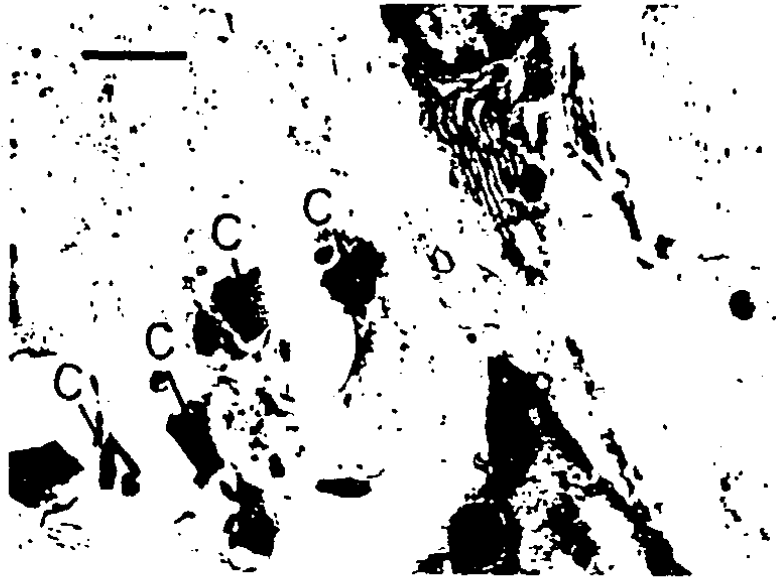


Figura 4. Electromicrografía de un corte semifino de pulmón de rata después de 60 días de la instalación de 35 mg de sílice. Se observan cristales de sílice (C) en el interior de un macrófago. Barra = 1 μ m.

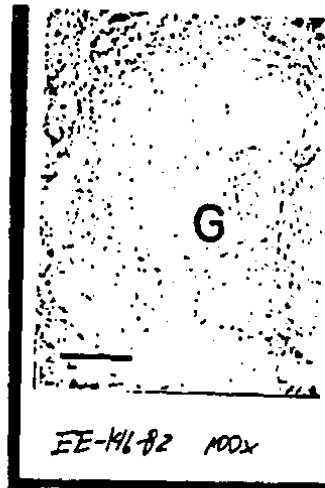


Figura 5A

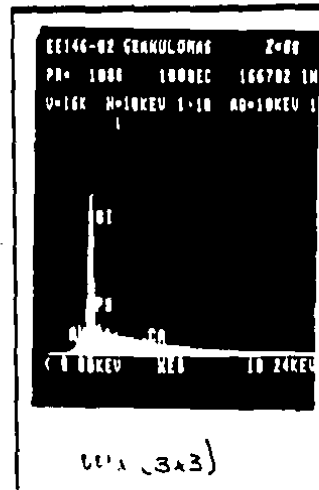


Figura 5B

Figura 5A. Electromicrografía de un granuloma observado con microscopía electrónica de barrido. 100X. Barra = 200 μ m.

Figura 5B. Patrón del microanálisis de rayos X para silicio del granuloma de la figura 5A.

TABLA 2. PESO HUMEDO (mg) DEL PULMON IZQUIERDO DE RATAS INSTILADAS CON 35 mg DE SILICE Y DE PULMONES NORMALES EN DIFERENTES DIAS DESPUES DE LA INSTILACION.

TIEMPO DESPUES DE LA INSTILACION					
	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
No.	GRUPO EXPERIMENTAL				
1	2312.5	942	2092	1472.9	2002.9
2	995.4	1025.1	1416.6	1528.6	1283.6
3	776.4	1121.1	1566.6	1758.1	1772.5
4	882.4	1067.1	1439.9	1205.8	1713.7
5	891.7	793	1307	1801.9	2051.5
6	1036.5	998.6	1340.5	1653.2	1659.8
7	1269.8	1427.3	979.8	1139.6	1855.4
8	2201.7	842.6	1640.1	1387.9	
	$\bar{X} \pm D.E.$				
	1295.92 [±] 611.61	1027.1 [±] 195.48	1472 [±] 319	1493.5 [±] 242.4	1762.7 [±] 255.7
GRUPO CONTROL					
	677.5	464.9	632.7	1076	950
	692.3	654.9	1023	868	933
	740.3	681.1	789.2	802	924
	673.2	736.2	819.3	1065	930
	$\bar{X} \pm D.E.$				
	695.8 [±] 30.8	634.3 [±] 118	816 [±] 164.4	952.7 [±] 138.7	934.3 [±] 11.2

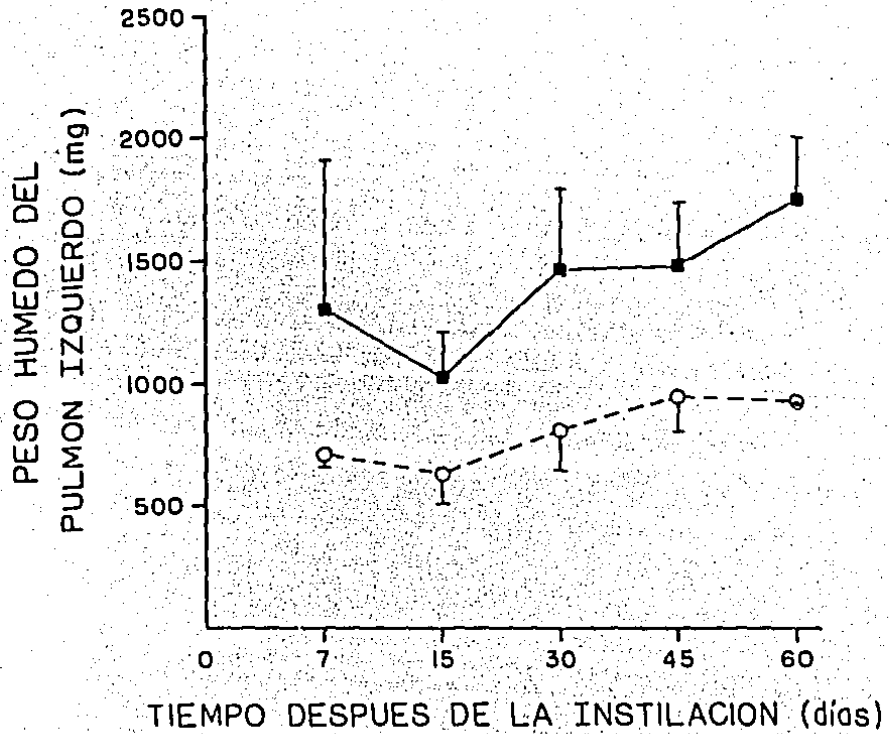


Figura 6. Cinética del peso humedo del pulmón izquierdo de ratas instiladas con 35 mg de sílice y de pulmones normales. Las líneas verticales representan $\bar{x} \pm D.E.$ Línea continua pulmones silicóticos; línea discontinua, pulmones normales. $p < 0.01$ a los 15, 30 y 45 días. $p < 0.001$ a los 60 días.

TABLA 3. PESO SECO (mg) DEL PULMON IZQUIERDO DE RATAS INSTILADAS CON 35 mg DE SILICE Y DE PULMONES NORMALES EN DIFERENTES DIAS POSTERIORES A LA INSTILACION DEL SILICE.

TIEMPO DESPUES DE LA INSTILACION					
	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
No.	GRUPO EXPERIMENTAL				
1	462.68	190.4	542	374.1	420.6
2	199.08	205.02	377.7	428	269.5
3	155.28	224.22	371.9	539.7	340.3
4	176.48	231.42	311.3	518.4	325.6
5	178.34	158.6	273.5	374.4	471,8
6	207.3	199.72	274.5	434.2	356.8
7	253.96	285.46	229.5	431.4	397
8	440.34	168.52	367.9	324.7	
	$\bar{X} \pm D.E.$				
	259.2 [±] 122.32	205.67 [±] 38.98	343.54 [±] 96.85	428.1 [±] 72.8	368.8 [±] 66.7
	GRUPO CONTROL				
	135.5	92.8	126.54	215.2	164.3
	138.46	130.9	204.6	173.6	158
	148.06	136.22	157.84	160.4	175
	134.64	147.24	163.86	213	158
	$\bar{X} \pm D.E.$				
	139.16 [±] 6.15	126.8 [±] 23.7	163.1 [±] 32	190.55 [±] 27.7	163.8 [±] 8.0

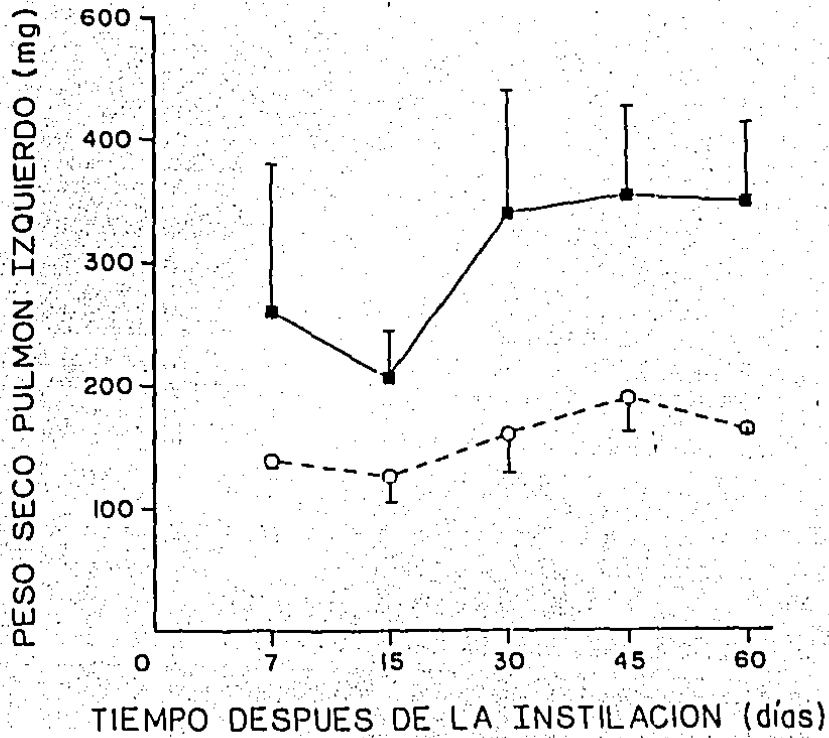


Figura 7. Cinética del peso seco del pulmón izquierdo de ratas instiladas con 35 mg de sílice y de pulmones normales. Las líneas verticales representan $\bar{X} \pm D.E.$ Línea continua, pulmones silicóticos; línea discontinua, pulmones normales.
 $p < 0.01$ a los 15 y 30 días.
 $p < 0.001$ a los 45 y 60 días.

nificativas con los pulmones normales (tabla 4 y fig. 8).

Cuando los resultados fueron expresados como contenido de colágena (mg de colágena/pulmón) se apreciaron aumentos significativos en los pulmones de ratas sacrificadas a los 15,30,45 y 60 días ($p < 0.05$ a los 15 y 60 días y $p < 0.001$ a los 30 y 45 días) (tabla 5 y fig. 9), aunque la diferencia fué más notoria a los 30 y 45 días.

BIOSINTESIS DE COLAGENA Y PROTEINAS NO COLAGENICAS.

La biosíntesis de colágena pulmonar se expresó de dos maneras: como porcentaje de síntesis de colágena respecto a proteínas totales (% de síntesis) y como cuentas por minuto incorporadas en proteínas colagénicas por pulmón (c.p.m./pulmón). Cuando los resultados se expresaron como porcentaje no se encontraron diferencias significativas en los pulmones instilados con sílice y normales (tabla 6 y fig. 10); mientras que al expresar los resultados como c.p.m./pulmón se encontró un aumento significativo en la síntesis de colágena en los pulmones de las ratas sacrificadas a los 7,45 y 60 días ($p < 0.05$ en los 3 tiempos) (tabla 7 y fig. 11).

ACTIVIDAD COLAGENOLITICA.

Al comparar en promedio la degradación de colágena de los pulmones que fueron instilados con sílice en re-

TABLA 4. CONCENTRACION DE COLAGENA (mg/g tej. seco) EN EL PULMON IZQUIERDO DE RATAS INSTILADAS CON 35 mg DE SILICE Y PULMONES NORMALES EN DIFERENTES DIAS POSTERIORES A LA INSTILACION.

TIEMPO DESPUES DE LA INSTILACION					
	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
No.	GRUPO EXPERIMENTAL				
1	43.71	74.5	83.63	153.8	209.2
2	52.8	73.9	92.92	112.9	70.2
3	62.3	65.3	106.86	85.5	121.2
4	50.48	66.89	73.53	130.9	95.7
5	52.76	80.0	110.73	97.3	95.9
6	47.68	65.89	91.91	117.8	106.9
7	68.59	63.05	96.64	97.7	79.7
8	69.63	73.34	87.55	87.0	
	$\bar{X} \pm D.E.$				
	55.99 [±] 9.68	70.36 [±] 5.89	92.98 [±] 12.05	110.36 [±] 23.5	111.2 [±] 46.3
	GRUPO CONTROL				
	48.64	61.78	73.6	68.7	72.0
	65.91	80.6	74.8	74.8	81.3
	65.0	65.37	69.4	83.4	69.0
	63.48	75.03	82.1	72.2	73.0
	$\bar{X} \pm D.E.$				
	60.76 [±] 8.14	70.7 [±] 8.65	74.97 [±] 5.28	74.77 [±] 6.27	73.8 5.3

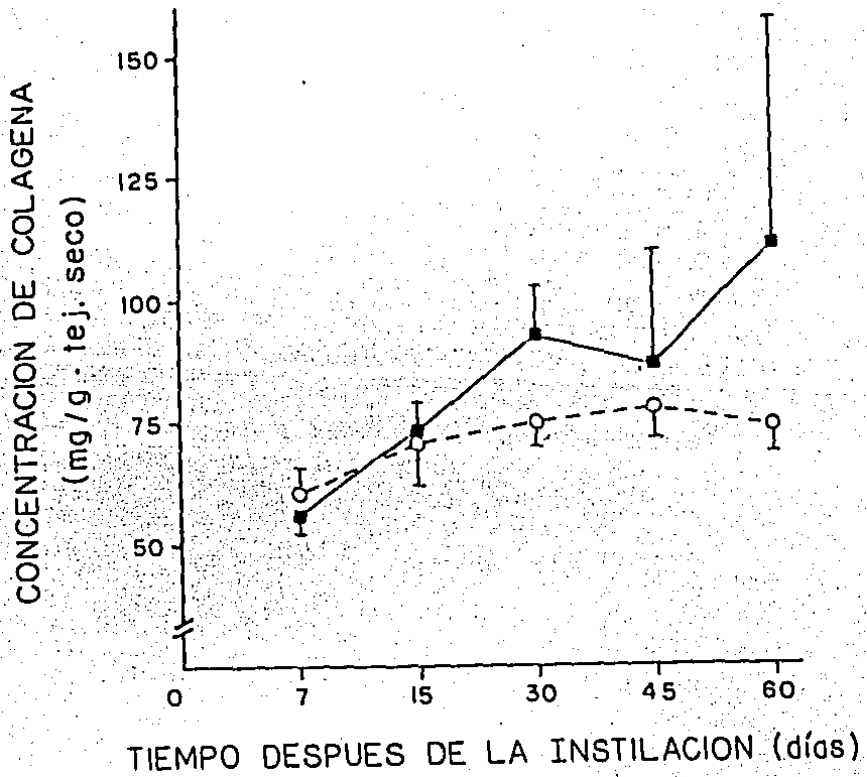


Figura 8. Cinética de la concentración de colágena en pulmones de ratas instiladas con 35 mg de sílice y de pulmones normales. Las líneas verticales representan $\bar{x} \pm D.E.$ Línea continua, pulmones silicóticos; línea discontinua pulmones normales.

$p < 0.05$ a los 30 y 45 días.

TABLA 5. CONTENIDO DE COLAGENA (mg de col./pulmón) EN PULMONES DE RATA INSTILADOS CON 35 mg DE SILICE Y PULMONES NORMALES EN DIFERENTES DIAS POSTERIORES A LA INSTILACION.

TIEMPO DESPUES DE LA INSTILACION					
	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
No.	GRUPO EXPERIMENTAL				
1	20.23	12.24	45.32	57.54	88.0
2	10.51	14.64	35.09	48.33	18.9
3	9.67	13.15	39.74	46.14	41.2
4	10.46	9.05	22.9	67.85	31.1
5	13.4	12.69	30.29	36.44	45.2
6	20.99	13.16	25.23	51.14	38.1
7	37.26	18.0	22.17	42.15	31.6
8	7.72	12.36	32.2	28.25	
	$\bar{X} \pm$ D.E.				
	12.28 \pm 9.79	13.16 \pm 2.51	31.39 \pm 7.81	47.2 \pm 12.2	42.2 \pm 21.9
GRUPO CONTROL					
	6.59	5.74	7.2	10.5	11.8
	9.12	10.55	10.0	7.2	12.8
	9.62	8.9	8.2	8.3	12.0
	8.55	11.06	11.1	10.7	12.2
	$\bar{X} \pm$ D.E.				
	8.47 \pm 1.33	9.1 \pm 2.4	9.12 \pm 1.2	9.17 \pm 1.7	12.2 \pm 0.43

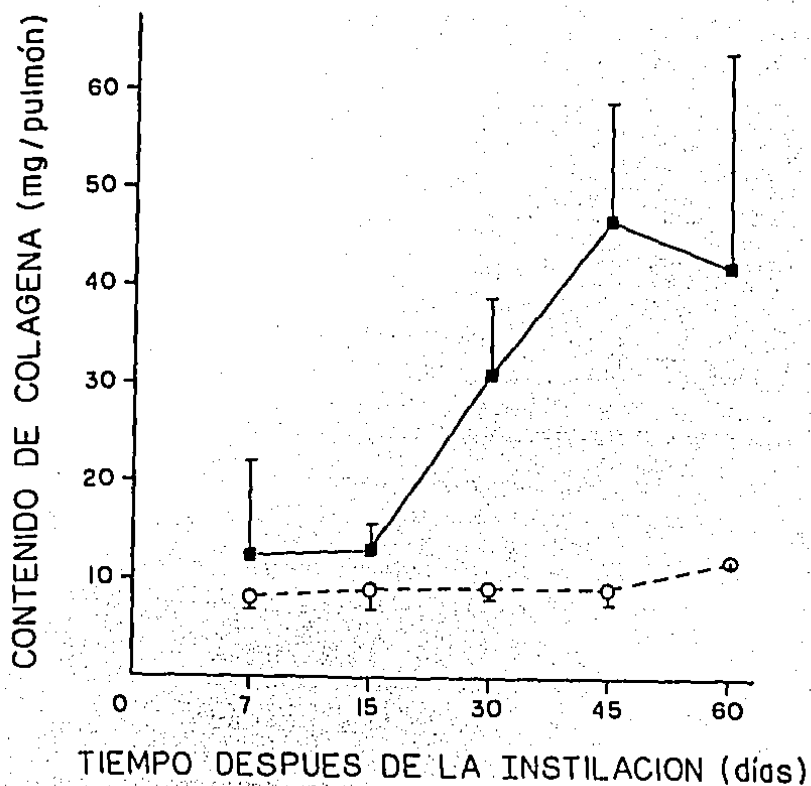


Figura 9. Cinética del contenido de colágena en pulmones de rata instilados con 35 mg de sílice y pulmones normales. Las líneas verticales representan $\bar{X} \pm D.E.$ línea continua, pulmones silicóticos; línea discontinua pulmones normales.
 $p < 0.05$ a los 15 y 60 días.
 $p < 0.001$ a los 30 y 45 días.

TABLA 6. PORCENTAJE DE SINTESIS DE COLAGENA EN PULMONES DE RATA INSTILADOS CON 35 mg DE SILICE Y DE PULMONES NORMALES EN DIFERENTES DIAS POSTERIORES A LA INSTILACION.

TIEMPO DESPUES DE LA INSTILACION					
	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
No.	GRUPO EXPERIMENTAL				
1	1.02	1.42	1.55	1.25	1.66
2	1.12	1.19	1.3	2.25	1.63
3	1.27	1.1	1.6	2.13	1.48
4	1.42	1.1	1.53	1.85	1.83
5	1.59	1.17	1.3	1.49	1.64
6	1.13	1.31	1.2	1.92	1.72
7	0.94	1.65	1.3	2.09	1.92
8	1.13	1.07	1.4	1.82	
	$\bar{X} \pm D.E.$				
	1.2 [±] 0.21	1.25 [±] 0.2	1.4 [±] 0.146	1.95 [±] 0.22	1.69 [±] 0.14
	GRUPO CONTROL				
	1.21	0.98	1.5	1.86	1.71
	1.3	1.17	1.64	2.05	1.89
	1.3	1.15	1.3	2.04	1.75
	0.76	1.01	1.4	2.05	1.75
	$\bar{X} \pm D.E.$				
	1.14 [±] 0.26	1.08 [±] 0.1	1.46 [±] 0.145	2.0 [±] 0.1	1.77 [±] 0.8

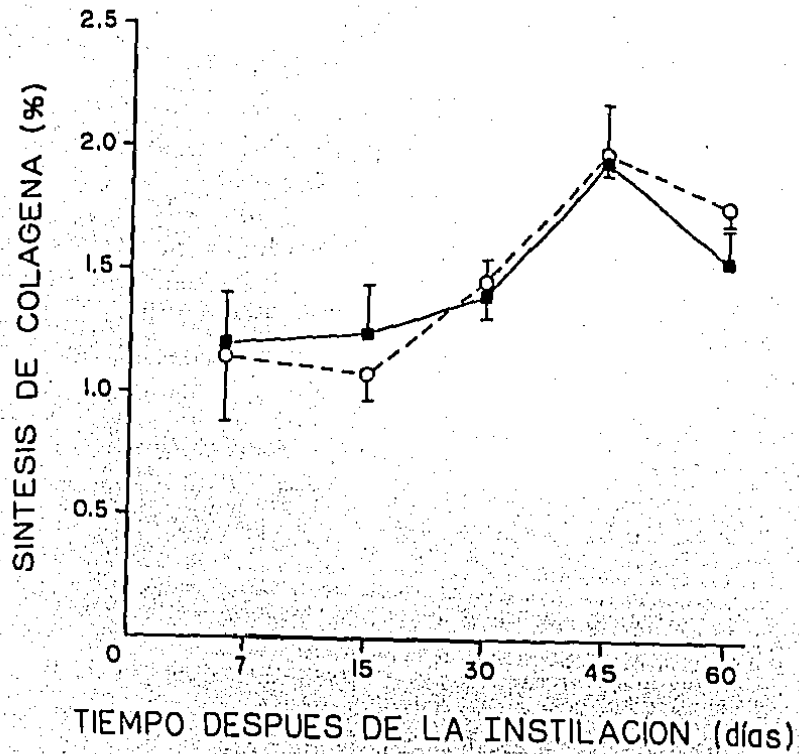


Figura 10. Cinética del porcentaje de síntesis de colágeno en pulmones de rata instilados con sílice y pulmones normales. Las líneas verticales representan $\bar{x} \pm D.E.$ Línea continua, pulmones silicóticos; línea discontinua, pulmones normales.

TABLA 7. BIOSINTESIS DE COLAGENA (c.p.m. de OH-Pro-³H/pul-
món/4horas) EN PULMONES DE RATA INSTILADOS CON 35
mg DE SILICE Y PULMONES NORMALES EN DIFERENTES DIAS
POSTERIORES A LA INSTILACION.

TIEMPO DEPUES DE LA INSTILACION					
	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
No.	GRUPO EXPERIMENTAL				
1	125660	92051	86504	136405	68359
2	131936	101658	103085	69184	184222
3	141954	75756	215109	118074	129862
4	69000	123667	70296	111048	140472
5	130737	110806	124465	170768	100185
6	147516	83058	55711	122376	136543
7	70010	167271	77051	148912	110526
8	164403	202327	210605	87665	
$\bar{X} \pm D.E.$					
	122652 [±] 34937	119574 [±] 43994	117853 [±] 62214	120554 [±] 32508	124310 [±] 36363
GRUPO CONTROL					
	87562	94147	35051	84552	86725
	60088	53128	68849	68346	50320
	70228	78860	46917	54360	69499
	84120	71144	60014	96723	81746
$\bar{X} \pm D.E.$					
	75499 [±] 11112	74345 [±] 17016	65083 [±] 15800	75995 [±] 18524	72072 [±] 16207

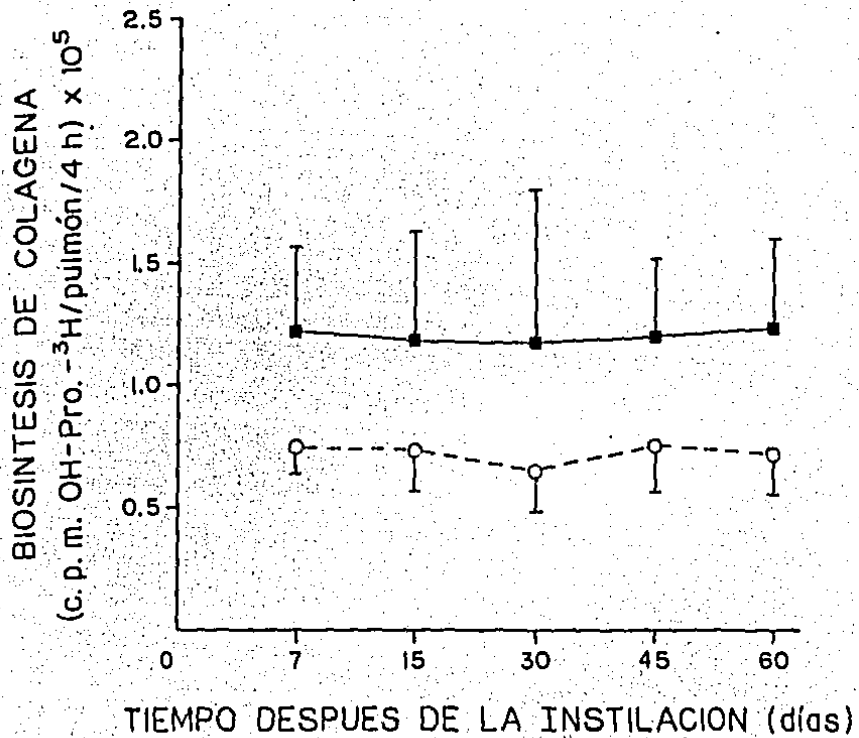


Figura 11. Cinética de la biosíntesis de colágena (c.p. m. de OH-Pro-³H/pulmón/4 horas.) en pulmones de rata instilados con 35 mg de sílice y pulmones normales. Las líneas verticales representan $\bar{X} \pm D.E.$ Línea continua, pulmones silicóticos; línea discontinua, pulmones normales.

$p < 0.05$ a los 15, 45 y 60 días.

lación con los pulmones normales, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de estudio (fig. 12). No obstante, la degradación de colágena en los pulmones instilados con sílice mostró tres tendencias diferentes: en algunos animales la degradación estuvo aumentada, en otros disminuída y en algunos fué similar a la de los controles (tabla 8). En este sentido, a los 7 días, los animales 5 y 2 presentaron una colagenolisis de 9.82 ± 0.014 contra 6.32 ± 0.72 de los controles; los animales 1 y 4, mostraron una colagenolisis de 5.76 ± 0.148 , la cual fué semejante a la de los controles; finalmente, las ratas 3, 8, 7 y 6 presentaron una disminución con un promedio de 3.63 ± 0.63 .

A los 15 días, las ratas 1, 5, 3 y 4 mostraron su colagenolisis muy aumentada, con un promedio de 16.17 ± 3.65 contra 7.28 ± 0.84 de los controles y los animales 2, 7, 6 y 8 presentaron un valor promedio de 1.7 ± 1.75 , el cual es muy inferior a la degradación de colágena observada en los controles (tabla 8).

A los 30 días, los animales 5 y 6, mostraron su degradación de colágena aumentada con un promedio de 11.93 ± 1.45 contra 6.85 ± 0.93 en los controles; en la rata 1, la colagenolisis fué similar a la de los controles y en las ratas 7, 4, 2, 3 y 8 la degradación fué inferior con un promedio de 3.17 ± 1.91 (tabla 8).

A los 45 días, los animales números 2 y 3 tuvieron

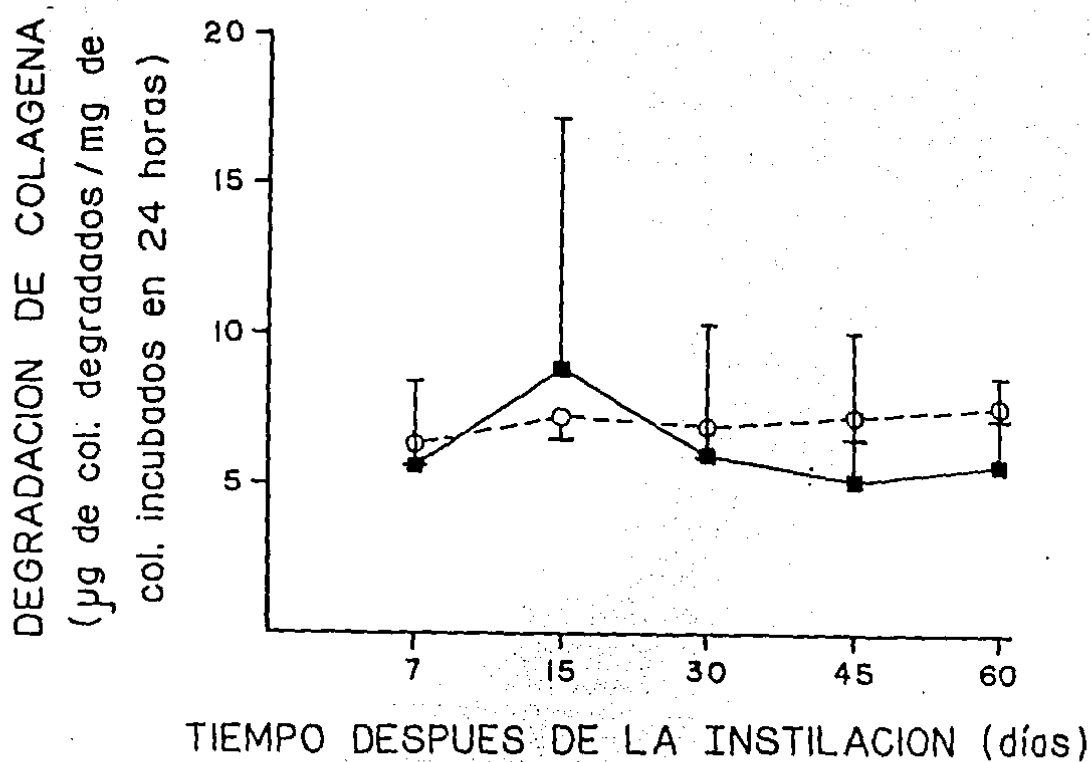


Figura 12. Cinética de la degradación de colágena en pulmones de rata instilados con 35 mg de sílice y pulmones normales. Las líneas verticales representan $\bar{X} \pm D.E.$ Línea continua, pulmones silicóticos; línea discontinua pulmones normales.

TABLA 8 . DEGRADACION DE COLAGENA (μ g de col.deg./mg de col. inc/24 horas.) EN PULMONES DE RATA INSTILADOS CON 35 mg DE SILICE Y PULMONES NORMALES EN DIFERENTES DIAS POSTERIORES A LA INSTILACION.

TIEMPO DESPUES DE LA INSTILACION									
7 días		15 días		30 días		45 días		60 días	
No.	GRUPO EXPERIMENTAL								
5	9.81	1	20.64	5	12.96	2	13.2	7	9.78
2	9.83	5	17.16	6	10.9	3	9.56	5	9.36
4	5.87	3	14.88	1	7.92	4	7.16	6	5.74
1	5.66	4	12.0	7	5.28	1	1.92	2	3.98
3	4.27	2	4.08	4	5.08	5	1.32	4	3.62
8	4.08	7	1.94	2	2.64	6	0.96	1	3.43
7	3.09	6	0.53	3	1.66	7	0.84	3	2.66
6	3.07	8	0.24	8	1.20				
$\bar{X} \pm D.E.$									
	5.71^{\pm}		8.93^{\pm}		5.96^{\pm}		4.99^{\pm}		5.51^{\pm}
	2.73		8.18		4.32		4.99		2.93
GRUPO CONTROL									
	7.2		7.9		7.3		6.4		7.7
	6.6		6.6		5.8		8.1		7.4
	5.6		8.1		6.4		7.6		6.8
	5.9		6.5		7.9		6.7		8.0
$\bar{X} \pm D.E.$									
	6.32^{\pm}		7.28^{\pm}		6.85^{\pm}		7.2^{\pm}		7.48^{\pm}
	0.72		0.84		0.93		0.8		0.51

aumentada su degradación, con un valor promedio de 11.38 ± 2.57 contra 7.2 ± 0.8 de los controles; el animal número 4, mostró su colagenolisis semejante con 7.16 y los animales 1,5,6 y 7 inferior, con un promedio de 1.26 ± 0.48 (tabla 8).

A los 60 días, las ratas 7 y 5 mostraron una degradación mayor que la de los controles, con un promedio de 9.57 ± 0.29 contra 7.48 ± 0.51 en los controles; en cambio, las ratas 6,2,4,1 y 3 presentaron una disminución en la actividad colagenolítica con un promedio de 3.88 ± 1.14 .

PARTE B.

Al estudiar el efecto de los sobrenadantes de pulmones normales (SPN), pulmones silicóticos (SPS) y amortiguador salino de fosfatos (PBS) (control), sobre el metabolismo de colágena en explantes de pulmón normal, se encontró que ambos sobrenadantes incrementaron la biosíntesis de esta protefna (% de síntesis) de manera significativa (fig. 13); sin embargo, este efecto fué notablemente mayor con el SPS ($p < 0.001$), para los volúmenes de 1.0 y 2.0 ml. Todos los resultados obtenidos fueron independientes de los volúmenes de extracto pulmonar adicionado a las preparaciones de explantes pulmonares normales.

El efecto de PBS, SPN y SPS sobre la actividad colagenolítica, se muestra en la figura 14 .

Cuando se adicionaron 0.1 ml. de sobrenadante con teniendo factores solubles, las únicas diferencias significativas observadas fueron entre SPS y PBS ($p < 0.01$) y entre SPS y SPN ($p < 0.01$). Por otra parte, con la adición de 0.5 ml. de sobrenadante, se encontró un incremento notable en la degradación de colágena inducida por SPS ($p < 0.001$) pero no por SPN, en comparación con el control (PBS).

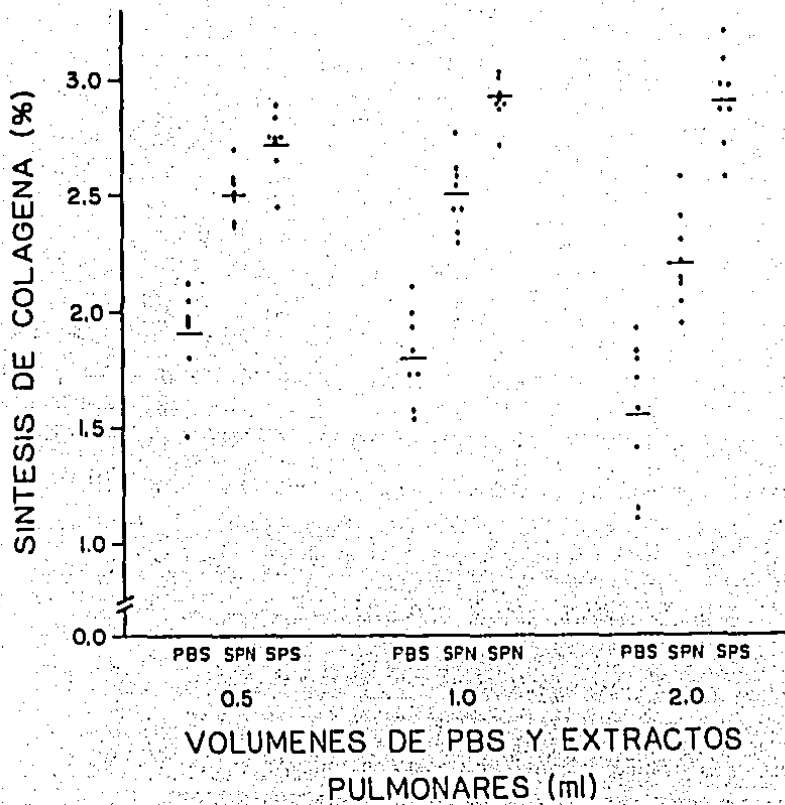


Figura 13. Porcentaje de síntesis de colágena en explantes de pulmón de rata incubados en presencia de: a) 0.5, 1.0 y 2.0 ml. de PBS (control); b) 0.5, 1.0 y 2.0 ml. de sobrenadante de pulmón silicótico (SPS).

$p < 0.001$ para 0.5 ml. de SPS contra PBS

$p < 0.001$ para 1.0 y 2.0 ml. de SPS y SPN contra PBS.

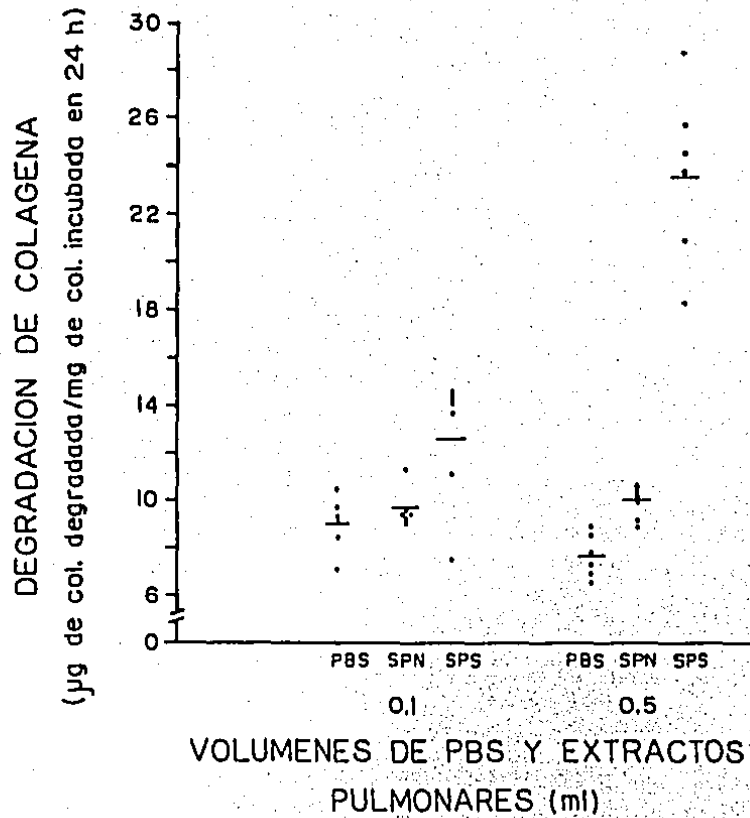


Figura 14. Degradación de colágena (μg de col.deg./mg de col. inc/24 horas) en explantes de pulmón normal incubados en presencia de :

a) 0.1 y 0.5 ml de PBS (control); b) 0.1 y 0.5 ml de SPN y; c) 0.1 y 0.5 ml de SPS.

$p < 0.001$ para 0.1 ml de SPS contra PBS

$p < 0.01$ para 0.1 ml. de SPS contra SPN

$p < 0.001$ para 0.5 ml. de SPS contra PBS y SPN.

DISCUSION.

La silicosis pulmonar continúa siendo una enfermedad ocupacional clínica y epidemiológicamente importante, por lo que son necesarios todos los intentos que puedan mejorar nuestro entendimiento sobre su patogénesis. Sin embargo, a pesar de numerosos estudios in vitro e in vivo, la fibrogénesis por sílice, que involucra una serie de procesos patológicos básicos no ha podido ser claramente elucidada.

En este sentido resulta difícil estudiar en el humano la secuencia de eventos morfológicos, inmunológicos, celulares y bioquímicos que se sucedan durante esta enfermedad, debido a que los pacientes acuden en estadios avanzados del padecimiento, cuando la terapia difícilmente produce resultados positivos (3). En vista de este hecho resulta de suma importancia el contar con un modelo animal de la enfermedad, que nos permita conocer su patogenia, así como la cinética de los eventos morfológicos, celulares, inmunológicos y bioquímicos involucrados.

Para la realización de este trabajo se desarrolló un modelo de silicosis en ratas con el propósito de investigar fundamentalmente el metabolismo de la colágena, la principal molécula involucrada en el proceso fibrogénico inducido por sílice.

Recientemente Selman y cols. (56) propusieron cuales deben ser los requerimientos mínimos de un modelo experimen-

tal de fibrosis pulmonar intersticial difusa (FPID), considerando las características de la enfermedad en el humano, éstas comprenden las siguientes:

- a) Ser crónico, progresivo y potencialmente letal;
- b) Presentar datos de desarrollo clínico, radiológico y funcional de insuficiencia respiratoria;
- c) Semejanza histológica y ultraestructural con la enfermedad del humano, las cuales incluyen: fibrosis septal alveolar, descamación alveolar, cuboidalización de las células del epitelio alveolar, inflamación intersticial, proliferación de células musculares y vías aéreas sin alteración; Estos eventos patológicos pueden no ocurrir simultáneamente pero deben tener una distribución multifocal, o preferentemente generalizada o difusa en todo el parénquima pulmonar;
- d) presentar un incremento absoluto en la cantidad de colágena pulmonar.

El estudio morfológico secuencial en este modelo fue consistente con estos requerimientos como puede observarse en las figuras 1, 2 y 3.

La ubicación de los granulomas fue alrededor de las vías aéreas (bronquiolos), lo cual es característico de la silicosis pulmonar humana (3) y se debe a la forma de depuración de sílice de los espacios alveolares por los macrófagos intraalveolares (12,60).

El exudado celular inflamatorio en los granulomas incipientes, estuvo constituido, por células del sistema fagocítico mononuclear, neutrófilos y células linfoides, siendo

predominante la población de macrófagos, tal como ha sido observado en otros estudios (14,60,61).

Se ha demostrado que los macrófagos del espacio alveolar son los responsables de la translocación de los cristales de sílice hacia el intersticio alveolar (12,61), muchos de estos macrófagos son destruidos por autólisis y liberan al medio diversas enzimas lisosomales, radicales libres de oxígeno que favorecen la inflamación y diferentes factores solubles; estos últimos incluyen factores quimiotácticos para neutrófilos y un factor fibrogénico (1-5); los radicales libres y las enzimas lisosomales se han propuesto como inductores del proceso inflamatorio, junto con los factores quimiotácticos (6,9).

La hiperplasia de los neumocitos tipo II que produce la cuboidalización del epitelio alveolar se ha propuesto como un mecanismo de reparación epitelial al ser destruidos los neumocitos tipo I (6), además existen evidencias de que estas últimas células pueden ser una vía para la translocación del sílice de los espacios alveolares al intersticio alveolar, ya que se han observado los cristales de sílice en su interior (12).

El estudio morfológico secuencial demostró también que en los granulomas de animales sacrificados en tiempos mayores fué más alta la cantidad de colágena, como se demostró con las tinciones tricrómica de Massón y la del rojo de sirio (fig. 3), además algunos granulomas se hialinizaron,

siendo granulomas maduros.

La cuantificación bioquímica de la colágena correlacionó adecuadamente con las observaciones morfológicas, al expresar la cantidad de colágena como concentración y principalmente como contenido; asimismo está de acuerdo con la proposición de Selman y cols. para un modelo de FPID (56). La expresión como contenido en términos absolutos, parece reflejar de manera más adecuada la respuesta del pulmón en relación con el metabolismo de la colágena con respecto a la instilación de los cristales de sílice, ya que la expresión como concentración puede enmascarar el aumento en la cantidad de colágena, debido al aumento concomitante de otras moléculas pulmonares tales como: proteínas no colagénicas y lípidos (62). Esto mismo ha sido observado en otros modelos experimentales inducidos con agentes como bleomicina (63), paraquat (64) e hidroxitolueno-butilado (65).

La cinética de la concentración y contenido de colágena pulmonar mostró un patrón ascendente con el tiempo (figs 6 y 7). Ahora bien ¿A qué se debe el aumento en el contenido de colágena en los pulmones de ratas silicóticas?

En términos finales el aumento en el depósito de colágena tisular se debe a un desbalance en el metabolismo de esta proteína, pudiendo ocurrir en algún momento : a) un aumento de la síntesis de colágena, b) una disminución de su degradación y c) ambos fenómenos al unísono o espaciados temporalmente. En este estudio el aumento observado en la con-

centración y contenido de colágena se debe posiblemente a un aumento en la biosíntesis, ya que a los 7 días (fig. 11) ésta se encuentra aumentada, igualmente a los 45 y 60 días de la instilación (fig. 11). La observación de que expresada como porcentaje de síntesis, la producción de colágena no se encuentre incrementada, puede deberse al aumento en la síntesis de proteínas no colagénicas. Por otro lado, es posible que una disminución en la actividad colagenolítica contribuya al desarrollo de la fibrosis, cuando menos en algunos animales, ya que en todos los tiempos estudiados entre el 50 y el 71% de ellos presentaban un decremento en la colagenólisis . Sin embargo, es conveniente destacar, que no hubo una relación directa entre el mayor o menor contenido de colágena pulmonar con el aumento de la biosíntesis y/o la disminución de la degradación. Ahora bien, si el aumento en la biosíntesis de colágena participa en el incremento del depósito de esta proteína, ¿ Cuáles son los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno ?.

En este sentido es necesario considerar la participación de los fibroblastos pulmonares como las células responsables de la producción de las colágenas intersticiales, además de su relación con otras células, fundamentalmente con los macrófagos alveolares de los cuales se sugiere que modulan el proceso fibrogénico en la silicosis por medio de la secreción de factores solubles (4).

Se conocen diversos factores quimioatrayentes para fibroblastos, los cuales podrían participar en el aumento de los fibroblastos productores de colágena en el interior de los granulomas silicóticos. Entre estos factores se incluyen el factor quimiotáctico derivado del suero (con peso molecular de 80,000) derivado del complemento (5), el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor quimiotáctico derivado de linfocitos, la fibronectina (en su sitio de unión a heparina) y péptidos derivados de la digestión de colágena, el leucotrieno B₄, elastina, colágenas I, II y III y las cadenas α de colágena (gelatina) (66).

Otros factores estimulan in situ la proliferación de fibroblastos, aumentando así las células productoras de colágena; factores tales como: el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de 60,000 daltones derivado de linfocitos T y la interleucina 1 (67), la cual se produce por cultivos de macrófagos estimulados con sílice, favoreciendo la proliferación de fibroblastos (68), esto sugiere que éste mecanismo podría ocurrir en el modelo desarrollado para el presente estudio.

Finalmente, es necesario considerar los factores que inducen aumento en la producción de colágena por los fibroblastos, pudiendo ocurrir este mecanismo solo o combinado con los factores de proliferación y de quimiotaxis en el desarrollo de los granulomas silicóticos. Se conocen entre es-

tos estimuladores: el factor de crecimiento epidermoide, el factor de crecimiento derivado de fibroblastos pulmonares y el factor de los linfocitos T (67). Existe además de estas moléculas potencialmente susceptibles de aumentar la producción de colágena un factor fibrogénico que ha sido aislado de macrófagos cultivados en presencia de cristales de sílice, tal factor es una lipoproteína que contiene 3 subunidades de 23,49 y 71 kilodaltones y que estimula la producción de colágena pero no la de proteínas no colagénicas (19,69), es posible que este factor pudiera sintetizarse localmente en los granulomas silicóticos.

Por otra parte, es necesario considerar la participación de la colagenólisis en el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por sílice. Durante el desarrollo de los granulomas silicóticos ocurre un remodelamiento activo de las moléculas de la matriz extracelular, primeramente durante la etapa inflamatoria y posteriormente durante la etapa fibrogénica (69-71). Es en este remodelamiento cuando la colagenólisis puede participar evitando la acumulación excesiva de la colágena; sin embargo, esto no ocurre en todas las ratas como ya se demostró en los resultados. Más aún, en aquellos animales en los que se observó una disminución en la degradación de la colágena, esta podría favorecer el desarrollo del proceso fibrogénico, tal como ha sido demostrado recientemente en la fibrosis pulmonar idiopática difusa humana, en la que en los estadios avanzados del padecimiento la disminución en la colage

nólisis se consideró responsable del incremento de la colágena pulmonar (59). Una situación similar se ha observado en otros modelos de fibrosis, tanto pulmonar (Montaña, R.M., Ramos, A.C., Selman, L.M., Metabolismo de colágena en fibrosis pulmonar inducida por paraquat y O_2 ; manuscrito en preparación) como renal (González, G., Vadillo, F., Pérez-Tamayo, R., comunicación personal).

El decremento en la actividad colagenolítica en algunos animales puede deberse a diversos factores. En principio que la procolagenasa (zimogeno inactivo de la colágenasa) se sintetice en cantidades menores de lo normal. En la actualidad se conocen diversos agentes que inducen este efecto, tales como: glucocorticoides, retinoides y estrógenos (36, 40). Otra causa podría ser que la procolagenasa no sea secretada localmente en los granulomas. En este sentido, existen agentes como el ácido retinoico que inhiben la secreción de la procolagenasa. Otra posible causa podría ser que la procolagenasa no se convierta en la enzima activa (colagenasa) o bien que la colagenasa estuviera inhibida por agentes como la B_1 -anticolagenasa, α_2 -macroglobulina y ciertas glucoproteínas (36, 40).

Finalmente habría que considerar que la colagenasa no interaccionara con la colágena debido a que esta no estuviera despolimerizada de otras macromoléculas de la matriz extracelular a las que se asocia (proteoglicanos, elastina y fibronectina), para lo cual se requiere de la acción previa de en

zimas conocidas como despolimerasas (72).

Independientemente de los presuntos mecanismos involucrados en la disminución de la degradación en algunos animales, un hecho que consideramos de gran interés, es la tendencia trimodal que se observó en relación a la actividad colagenolítica. Esto es, que en algunas ratas estaba elevada, en otras (las menos) en niveles normales y finalmente, en algunas disminuida; este hallazgo, no pareció correlacionarse con algún tiempo en particular del estudio, aún cuando las cifras más altas fueron encontradas a los 15 días de evolución. Esta heterogeneidad en el comportamiento de los pulmones silicóticos no puede ser atribuida a factores técnicos, dado que en los animales normales los resultados fueron bastante homogéneos; por lo tanto parece ser inherente al fenómeno patológico.

En este sentido, es de interés comentar que en estudios recientes en nuestro laboratorio, analizando el tejido pulmonar de pacientes con Alveolitis alérgica extrínseca, una enfermedad inflamatoria intersticial que eventualmente puede evolucionar a la fibrosis, hemos encontrado un fenómeno similar (Montaña, R.M., Ramos, A.C., Selman, L.M., manuscrito en preparación). Sorprendentemente, los resultados de la degradación han mostrado una tendencia a asociarse con el pronóstico; es decir, en aquellos pacientes que muestran un aumento en la colagenólisis en el momento del estudio, la enfermedad revierte y el parénquima pulmonar se recupera ad

integrum . En cambio, los casos en los que hemos encontrado una disminución en la actividad colagenolítica, han empeorado y uno de ellos falleció con fibrosis intersticial difusa. Desgraciadamente, esta correlación con el pronóstico no pudo realizarse en el modelo de silicosis puesto que los animales se sacrificaron en el momento del estudio. Sin embargo, pensamos que el hallazgo puede corresponder a una situación similar a la encontrada en los humanos.

El segundo experimento desarrollado para demostrar el efecto de factores solubles obtenidos de pulmones silicóticos sobre el metabolismo de colágena en pulmones normales, se realizó con ratas que tenían 2 meses de la instilación del sílice, debido a que en este tiempo ya ha sido bien establecida la silicosis pulmonar, tal como fué demostrado por el estudio morfológico y bioquímico en este mismo estudio.

Los resultados sugieren que tanto el SPN como el SPS contienen factores solubles capaces de estimular la biosíntesis de colágena en los explantes de pulmón normal (fig. 13). La posibilidad de que la diferencia en la magnitud del efecto observado entre el SPN y el SPS se deba al gran número de células presentes en el nódulo silicótico (macrófagos y fibroblastos), comparado con la escasa celularidad del pulmón normal se puede considerar poco probable, ya que el efecto observado con 2.0 ml fué muy similar al de 1.0 ml, por esta misma razón se puede sugerir que la diferencia entre el SPN y el SPS es posiblemente más cualitativa que cuantitativa.

Estos resultados difieren de los encontrados por Phan y cols. (58). quienes observaron que extractos de pulmón de rata tratados previamente con bleomicina inhiben la síntesis de colágena en explantes de pulmón normal. La diferencia puede ser debida a la utilización de un modelo experimental diferente de fibrosis pulmonar.

Es probable que el incremento observado en la biosíntesis de colágena en los explantes de pulmón normal por el SPN y SPS se relacione con la presencia de factores solubles derivados de macrófagos que estimulen la proliferación de fibroblastos (73,74), o bien factores fibrogénicos como el que ha sido purificado de macrófagos cultivados en presencia de sílice (75,76).

La degradación de colágena en los homogenados de pulmón normal de rata se incrementó únicamente con el SPS sobre el nivel del control (con PBS) y en una manera dependiente de la dosis (fig. 14). Este resultado es interesante ya que sólo ocurre con el SPS, mientras que la biosíntesis de colágena fué estimulada con SPN y SPS; además, es notoria la magnitud de este incremento sobre la colagenólisis. En relación con las posibles causas de este incremento, se podría pensar que con el proceso de extracción del sobrenadante de los pulmones silicóticos probablemente se extrajo alguna colagenasa (77-79). Otra explicación alternativa pudiera ser que se aisló con el extracto un activador de la procolagenasa o de la colagenasa activa (45,80).

En este segundo experimento (parte B) se observaron efectos diferentes a los del primero (parte A). Mientras que en el primer experimento in vivo se incrementó significativamente la biosíntesis de colágena (expresada como cpm de hidroxiprolina incorporadas por pulmón), en la mayoría de los tiempos de estudio, con una degradación de colágena aumentada, normal o disminuida; en el segundo experimento in vitro con la adición de SPN y SPS se produjeron aumentos significativos en la biosíntesis de colágena en explantes de pulmón normal, pero solamente el SPS indujo incremento en la degradación de colágena. Por lo tanto, es interesante notar que en el SPS existen factores solubles capaces de estimular la degradación de la colágena (in vitro); sin embargo, en el pulmón silicótico (in vivo) la degradación presentó una forma trimodal, lo cual sugiere que el pulmón silicótico tiene la capacidad potencial de impedir el desarrollo del proceso fibrogénico, aunque parecen existir una serie de mecanismos que lo impiden, lo que hace al fenómeno más complejo y crea la necesidad de diseñar otros experimentos para entender este fenómeno con más detalle.

Se ha comunicado (81,82) que en los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática con anormalidades anatómicas avanzadas en el parénquima pulmonar existe un incremento en la actividad colagenolítica del tracto respiratorio inferior. Se ha sugerido que tal incremento participa en el desarreglo de las colágenas intersticiales, o simplemente que refleja el

incremento en la cantidad de colágena, ya que la colagenasa se une a las fibrillas de colágena extracelular en tejidos normales y patológicos (40,83).

Los resultados del presente trabajo plantean una serie de problemas por resolver, para lo cual se requerirá desarrollar trabajos experimentales específicos utilizando el modelo de silicosis pulmonar de este estudio. Algunos de estos problemas son los siguientes:

¿ Cuáles son los tipos genéticos de colágena presentes en los granulomas y en que proporción se encuentran ?

¿Cuál es la contribución de las colágenas de membranas basales en el desarrollo de la silicosis pulmonar ?

¿Cuál es la naturaleza molecular de los factores que inducen in vitro incrementos en la degradación y biosíntesis de colágena en los pulmones normales ?

¿Cuál es la fuente celular de los factores inductores de la biosíntesis y degradación de colágena en los pulmones normales ?

¿Cuál es el comportamiento de componentes macromoleculares no colagénicos como la fibronectina, elastina y proteoglicanos en el desarrollo de la silicosis ?

¿ Por qué la actividad colagenolítica presenta el comportamiento trimodal en el modelo in vivo ?

CONCLUSIONES .

1. El modelo cumple con los requerimientos básicos de acuerdo a las características de la enfermedad observada en el humano.

2. El proceso fibrogénico inducido por sílice parece deberse a un incremento en la biosíntesis de colágena y en algunos animales a una disminución en su degradación.

3. El contenido de colágena aumentó significativamente a los 15, 30, 45 y 60 días, mientras que expresada como concentración se incrementó solo a los 30 y 45 días de la instilación.

4. La instilación de una dosis única de 35 mg de sílice (polvo cuarzo DQ-12) es suficiente para inducir en la rata un proceso de fibrosis pulmonar difuso.

5. La adición de SPN y SPS incrementa significativamente la biosíntesis de colágena en explantes de pulmón normal de rata.

6. La adición de SPS incrementa significativamente la degradación de colágena en explantes de pulmón normal de rata.

BIBLIOGRAFIA.

1. McDonald, J.C., A historical perspective of occupational respiratory disease. J. UOEH. 4 (suppl): 7-17, 1982
2. Heppleston, A.G., Pulmonary toxicology of silica, coal and asbestos. Environ. Health. Perspec. 55: 111-127, 1984.
3. Ziskind, M., Jones, R.N., Weill, H., Silicosis. Am. Rev. Respir. Dis. 113: 643-665, 1976.
4. Reiser, K.M., Last, J.A., Silicosis and fibrogenesis: Fact and artifact. Toxicology. 13: 51-72, 1979.
5. Chvapil, M., Old-new problems of silicotic fibrosis. En biochemistry of silicon and related problems (eds. Bendz, G. and Lindquist, I.), Plenum Publishing Corporation, USA: 381-392, 1978.
6. Richards, R.J., Curtis, G.C., Biochemical and cellular mechanisms of dust-induced lung fibrosis. Environ. Health. Perspect. 55: 393-416, 1984.
7. Kleiman, J., Industrial pulmonary disease. En textbook of pulmonary disease, 2a. ed, (Baum, G.L. ed.). Little, Brown and Co., Boston, U.S.A: 489, 1974.
8. Gabor, S.Z., In vitro and in vivo quartz-induce lipid peroxidation. En The in vitro effects of mineral dust. (Brown, R.C., Chamberlain, M., Davies, R., Gormby, I.P., eds.). Academic Press, London : 289-297, 1980.
9. Halliwell, B., Production of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals by phagocytic cells: A cause of chronic inflammatory disease ?. Cell. Biol. Inter. Re-

port. 6: 529-542, 1982.

10. Allison, A.C., Morgan, D.M.L., Effects of silica, asbestos and other particles on macrophage and neutrophil liosomes. *Front.Biol.* 98: 149-159, 1979.
11. Shazo, R.D., Current concepts about the pathogenesis of silicosis and asbestosis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 70: 41-49, 1982.
12. Brody, A.R., Roe, M.W., Evans, J.N., Davis, G.S., Deposition and translocation of inhaled silica in rats. Quantification of particle distribution, macrophage participation and function. *Lab. Invest.* 47: 533-542, 1982.
13. Adamson, I.Y.R., Bowden, D.H., Role of polymorphonuclear leucocytes in silica-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 117: 37-43, 1984.
14. Bowden, D.H., Adamson, I.Y.R., The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis. *J.Pathol.* 144: 149-161, 1984.
15. Crystal, R.G., Rennard, S.I., Pulmonary connective tissue and environmental lung disease. *Chest (suppl.)* 80: 335-385, 1981.
16. Lapp, L.N., Lung disease secondary to inhalation of non fibrous minerals. *Clin. in. Chest Medicine.* 2: 219-233, 1981.
17. Chvapil, M., Eskelson, C.D., Stiffel, V., Owen, J.A., Early changes in the chemical composition of the rat lung after silica administration, *Arch. Environ. Health.*

- 34: 402-406, 1979.
18. Mirejovska, E., Bass, A., Hurych, J., Teisinger, J., Enzyme changes during experimental silicotic fibrosis. II. Intermediary metabolism enzymes of the lungs. *Environ. Res.* 25: 434-440, 1981.
 19. Jalkanen, M., Penttinen, R., Enhanced fibroblast collagen production by a macrophage-derived factor (CEMF). *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 108: 447-453, 1982.
 20. Heppleston, A.G., Silicotic fibrogenesis: a concept of pulmonary fibrosis. *Ann. Occup. Hyg.* 26: 449-462, 1982.
 21. Crystal, R.G., Gadek, J.E., Ferrans, V.J., Fulmer, J.D., Line, B.R., Hunninghake, G.W., Interstitial lung disease: Current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am. J. Med.* 70: 542-568, 1981.
 22. Crystal, R.G., Lung collagen: definition, diversity and development. *Federation Proc.* 33: 2248-2255, 1974.
 23. Minor, R.R., Collagen metabolism. *Am. J. Pathol.* 98: 227-277, 1980.
 24. Kleiman, H.K., Klebe, R.J., Martin, G.R., Role of collagen matrices in the adhesion and growth of cell. *J. Cell. Biol.* 88: 473-485, 1981.
 25. Odermatt, E., Risteli, J., Van Delden, V., Timpl, C.R., Structural diversity and domain composition of a unique collagenous fragment (intima collagen) obtained from human placenta. *Biochem. J.* 211: 295-302, 1983.
 26. Bentz, H., Morris, N.P., Murray, L.W., Sakai, L.Y., Hollister, D.W., Burgeson, R.E., Isolation and partial

- characterization of a new human collagen with an extended triple-helical structural domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 3168-3172, 1983.
27. Sage, H., Trueb, B., Bornstein, P., Biosynthetic and structural properties of endothelial cell type VIII collagen. J. Biol. Chem. 258: 13391-13401, 1983.
 28. Sage, H., Balian, G., Vogel, A.M., Bornstein, P., Type VIII collagen. Lab. Invest. 50: 219-231, 1984.
 29. Bruckner, P., Vaughan, L., Winterhalter, K.H., Type IX collagen from sternal cartilage of chicken embryo contains covalently bound glycosaminoglycans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 2608-2612, 1985.
 30. Van, D.R.M., Mayne, R., Ninomiya, Y., Seidah, N.G., Chretien, M., Reino, O.B., The structure of type IX collagen. J. Biol. Chem. 260: 220-225, 1985.
 31. Quarto, N., Cancedda, R., Descalzi-Cancedda, F., Purification and characterization of the low-molecular-mass (type X) collagen from chick-embryo tibial cartilage. Eur. J. Biochem. 147: 397-400, 1985.
 32. Schmid, T., Linsenmayer, T.F., Immunohistochemical localization of short chain cartilage (type X) in avian tissues. J. Biol. Chem. 100: 598-605, 1985.
 33. Prockop, D.J., Kivirikko, K.I., Tuderman, L., Guzman, N. A., The biosynthesis of collagen and its disorders. 301: 13-27, 77-85, 1979.
 34. Blobel, G.H., Transfer of proteins across membranes. II Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. J. Cell. Biol. 67: 852-862, 1975.

35. Woolley, D.E., Human collagenase: comparative and immunolocalization studies. En Protein degradation in health and disease. Ciba Found. Symp. 75: 69-86, 1980.
36. Werb, Z., Degradation of collagen. En Collagen in health and disease (Weiss, J.B. and Jayson, M.I.V., eds.). Churchill livingstone, New York: 121-134, 1982.
37. Nakamo, T., Scott, P.G., Purification and characterization of a gelatinase produced by fibroblasts from human gingiva, Biochem. Cell. Biol. 64: 387-393, 1986.
38. Krane, S., Collagen degradation. Connective tissue Research. 10: 51-59, 1982.
39. Harper, E., Collagenases. Ann.Rev. Biochem. 49: 1063-1078, 1980.
40. Harris, E.D., Welgus, H.G., Krane, S.M., Regulation of the mammalian collagenases. Collagen Rel. Res. 4: 493-512, 1984.
41. Welgus, H., Campbell, E.J., Bar-Shavit, Z., Senior, R. M., Teitelbaum, S.L., Human alveolar macrophages produce a fibroblast like collagenase and collagenase inhibitor. J. Clin. Invest, 76: 219-224, 1985.
42. Werb, Z., Gordon, S., Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. J. Exp. Med. 142: 361-377, 1975.
43. Kelman, J., Brind, S., Hortwitz, A., Bradley, K., Hance, A., Breul, S., Baun, B., Crystal, R.G., Collagen synthesis and collagenase production by human lung fibroblast. Am. Rev. Respir. Dis. 115: (suppl): 343-351, 1977.

44. Horwitz, A.L., Hane, A.J., Crystal, R.G., Granulocyte collagenase: selective digestion of type I relative to type III collagen. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74: 897-901, 1977.
45. Horwitz, A.L., Kelman, J.A., Crystal, R.G., Activation of alveolar macrophage collagenase by neutral protease secreted by the same cell. Nature. 264: 772-774, 1976.
46. Crystal, R.G., Bitterman, P.R., Rennard, S.I., Hance, A. J., Keogh, B.E., Interstitial lung diseases of unknown cause: disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. N. Engl. J. Med. 310: 154-244, 1984.
47. Rich, A.E., Seyer, J.M., Kang, H.A., Mainardi, C.L., Identification of a type V collagen-degrading enzyme from human sputum. Am. Rev. Respir. Dis. 128: 166-169, 1983.
48. Fritz, H., Protein inhibitors in severe inflammatory processes (septic shock and experimental endotoxaemia): biochemical, pathophysiological and therapeutic aspects. In Protein degradation in health and disease. Excerpta Medica. 75: 351-379, 1980.
49. Narayanan, A.S., Voss, T., Page, R.C., Transcriptional regulation of fibroblast collagen synthesis by activated mononuclear cell supernatants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 131: 1028-1032, 1985.

50. Allison, A.C., The role of microfilaments and microtubules in cell movement, endocytosis y exocytosis. En locomotion of cell tissue cells. Ciba Fund. Symp. 14: 109-148, 1973.
51. Harris, E.D., Kranes, S.M., Effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatoid synovium. Arthritis. Rheum. 14: 669-684, 1971.
52. Gordon, S., Werb, Z., Secretion of macrophage neutral proteinase is enhanced by colchicine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 872-876, 1976.
53. Luna, L.G., Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 2a. ed. McGraw-Hill Book Co. New York, U.S.A.: 36-39,94-95, 1960.
54. Junqueira, L.C.V., Bignolas, G., Bretani, R.R., Picrosirus staining plus polarizing microscopy, a specific for detection in tissue sections. Histochem. J. 11: 447-452. 1979.
55. Rojkind, M., González, E., An improved method for determining specific radioactivies of proline-C¹⁴ and hydroxyproline-C¹⁴ in collagen and non collagen proteins. Anal. Biochem. 57: 1-7, 1971.
56. Selman, M., Montaña, M., Monfort, I., and Pérez-Tamayo., A new model of diffuse interstitial pulmonary fibrosis in the rat. Exp. Mol. Path. 43: 375-387, 1985.
57. Cooper, T.C., The tools of biochenistry. John Wiley & Sons, New York: 100-101, 1977.
58. Phan, S.H., Thrall, R.S., The role of soluble factors in bleomycin induced pulmonary fibrosis. Am. J. Pathol.

106: 156-164, 1981.

59. Selman, M., Montaña, M., Ramos, C., Chapela, R., Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 41: 355-359, 1986.
60. Dauber, J.H., Rossman, M.D., Pietra, G.G., Jimenes, S. A., Daniele, R.P., Morphological and biochemical abnormalities produced by intratraqueal instillation of quartz into guinea pig lungs. *Am. J. Pathol*, 101: 595-612, 1980.
61. Davis, G.S., Hemenway, D.R., Evans, J.N., Alveolar macrophage stimulation and population changes in silica exposed rats. *Chest*, 80: 85-105, 1981.
62. Witschi, H.P., Tryka, A.F., Lindenschmidt, R.C., The many faces of an increase in lung collagen. *Fund. Appl. Toxicol*, 5: 240-250, 1985.
63. Digby, T.D., Allen, D., Lestre, C.G., Bleomycin-induced lung injury in the rabbit. Analysis and correlation of bronchoalveolar lavage, morphometrics, and fibroblast stimulating activity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 590-595, 1985.
64. Selman, M., Montaña, M., Monfort, I., Pérez-Tamayo, R., The duration of the pulmonary paraquat toxicity-enhancement effect of O₂ in the rat. *Exp. Mol. Pathol.* 43: 388-396, 1985.
65. 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.* 46: 438-448, 1982.
66. Albin, A., Adelman-Grill, B.C., Muller, D.K., Fibroblast chemotaxis. *Collagen Rel. Res.* 5: 283-292, 1985.
67. Seyer, J.M., Mediators of increased collagen synthesis in fibrosing organ. *Fund. Applied. Toxicol.* 5: 228-239, 1985.
68. Schmidt, J., Oliver, C.N., Lepe, J.L., Green, I., Gery, I., Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin 1. A potential role for interleukin 1 in the pathogenesis of silicosis. *J. Clin. Invest.* 73: 1462-1472, 1984.
69. Gritter, H.I., Adamson, Y.R., King, G.M., Modulation of fibroblast activity by normal and silica-exposed alveolar macrophages. *J. Pathol.* 148: 263-271, 1986.
70. Reynolds, J.J., The molecular and cellular interaction involved in connective tissue destruction, *Br.J. Dermatology.* 112: 715-723, 1985.
71. Hurych, J., Mirejovska, E., Koblir, V., Rencova, J., Enzymes changes during experimental silicotic fibrosis. I. PZ-peptidase and collagen deposition in the lung. *Environ. Res.* 25: 424-433, 1981.
72. Vaes, G., Macrophage secretory products and connective tissue remodeling: role of macrophage enzymes and of matrix regulatory monokines. In *Developments in cell biology. 1. Secretory processes* (R.T. Dean and Stahl, eds.) Butterworths, London: 99-117, 1985.
73. Leibovich, S.J., Ross, R.A., A macrophage dependent factor that stimulates the proliferations of fibroblasts

- in vitro. Am. J. Pathol. 84: 501-513, 1976.
74. Leibovich, S.J., Production of macrophage-dependent fibroblast -stimulating activity (MFSA) by murine macrophages. Exp. Cell. Res. 113: 47-56, 1978.
75. Heppleston, A.G., Styles, J.A., Activity of macrophage factor in collagen formation by silica. Nature. 214: 521-522, 1967.
76. Heppleston, A.G., Styles, J.A., Involvement of the macrophage in silicotic fibrogenesis . Fortschr Staublungenforsch. 2: 123-128, 1967.
77. Nagai, Y., Hori, H., Vertebrate collagenase: direct extraction from animal skin and human synovial membrane. J. Biochem. 72: 1147-1152, 1972.
78. Wirl, G., Extraction of collagenase from the 6000X g sediment of uterine and skin tissues from mice: A comparative study. Hoppe. Seylers. Ztschr. Physiol. Chem. 356: 1289-1295, 1975.
79. Weeks, J.G., Halme, J., Woessner, J.F. Jr., Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. Biochim. Biophys. Acta. 445: 205-212, 1976.
80. Werb, Z., Mainardi, C.L., Vater, C.A., Harris, E.D. Jr., Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. New. Engl. J. Med. 296: 1017-1023, 1977.
81. Gadek, J. E., Kelman, J.A., Fells, G., Ewinber, S.E., Horwitz, A.L., Reynolds, H.Y., Fulmer, J.D., Crystal, R.G., Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. New. Engl. J. Med.

301: 737-742, 1979.

82. Gadek, J.E., Fells, G.A., Zimmerman, R.L., Crystal, R.G.,
Role of connective tissue proteases in the pathogenesis
of chronic inflammatory lung disease. Environ. Health.
Perspect. 55: 297-306, 1984.
83. Suzuki, A., Kitamura, Y., Inoue, S., Nonami, Y., Saito, M.,
Collagen-bound collagenolytic enzyme in rabbit skeletal
muscle. Meat. Science. 14: 243-251, 1985.