



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de la expresión de la ADAMTS-5 en fibrosis pulmonar
idiopática.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA DEL JAZMÍN CALYECA GÓMEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DOCTORA ANNIE PARDO CEMO
2011



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.

1. Datos del alumno

Calyeca

Gómez

María del Jazmín

56 22 49 10

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

303271505

2. Datos del tutor

Dra

Annie

Pardo

Cemo

3. Datos del sinodal 1

Dr

Rolando

Hernández

Muñoz

4. Datos del sinodal 2

Dr

Víctor Manuel

Ruíz

López

5. Datos del sinodal 3

Dr

David

Graciadiego

Cázares

6. Datos del sinodal 4

M en C

María de los Remedios Josefina

Ramírez

Rangel

7. Datos del trabajo escrito

Análisis de la expresión de la ADAMTS-5
en fibrosis pulmonar idiopática

27 p

2011

En tiempo de siembra aprende, en la cosecha enseña, en el invierno disfruta...
...El zorro se provee para el mismo, pero Dios provee para el león...
...Piensa por la mañana, actúa al medio día, come por la tarde, duerma durante la noche...
... Ningún pájaro remonta alto al vuelo, si vuela con sus propias alas...
(Proverbios del infierno, William Blake)

Cualquiera puede dominar un sufrimiento, excepto el que lo siente
(William Shakespeare)

...Respetate a ti mismo, y todos te respetarán.
Entiendete a ti mismo, y todos te entenderán...
...Haz cuanto puedas para ayudar a otros.
En este sentido, ayúdate a ti mismo,
Ayuda a los demás, y ayudarás al mundo...
(Sifu Shi Yan-Ming)

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con apoyo de CONACYT

En primer lugar agradezco a Dios, quién me concedió la vida.

*A mi hermano, **Humberto César Calyeca Gómez**, por haber compartido su vida conmigo, por su apoyo, por sus regaños, por sus locuras y por haber hecho mi vida tan feliz; es a quién dedico esta tesis.*

A mis padres que me trajeron al mundo y son mi apoyo, que me guían y son la luz en mi senda. Y a mi abuelita, que me educó y cuidó.

A ti Enrique, que me ayudaste a encontrar de nuevo el camino de la vida, gracias por tu apoyo, por darme un motivo más de vida y por tu amor que me alienta cada día.

A mi hermano Beto, a quién amo a pesar de las peleas.

A la Dra Annie Pardo, no sólo por su apoyo académico, también por su apoyo moral en los momentos que más necesite.

A la M en C Remedios por haberme por su ayuda en mi formación académica en este laboratorio y su amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio por su ayuda y comprensión.

A mis amigos, en especial a Guillermo que a pesar de la distancia esta cerca de mí.

A mis compañeros del Templo Shaolin, al maestro Giovanni, que me apoyo siempre; y en especial al maestro Daniel, quién es para mí un ejemplo a seguir, por su dedicación y voluntad.

Al profesor Aullet, a quién debo el amor a la Biología.

Al Dr Pliego por ayudarme a recobrar mi vida, por soportarme tantos días en el hospital, a todo su equipo de médicos y en especial al Dr Pacheco quién hizo más amena mi estancia.

A todos mis profesores de la facultad que fueron sembrando en mí su enseñanza, y a ti mi Universidad que me abriste las puertas al conocimiento.

“Por mi raza hablará mi espíritu”

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	5
Resumen.....	6
Introducción.....	8
Composición de la Matriz Extracelular (MEC) del pulmón.....	8
Fibrosis pulmonar.....	9
Patogénesis de la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI).....	10
Metaloproteasas y desintegrinas con motivos de trombospondinas (ADAMTS).....	11
Familia ADAMTS.....	15
ADAMTS-5.....	16
Características y función.....	18
Activación y regulación.....	18
Ratones KO de la ADAMTS-5.....	20
ADAMTS-5 en FPI.....	21
Objetivo.....	22
Hipótesis.....	22
Métodos.....	23
Población de estudio.....	23
Síntesis de cDNA por Transcripción Inversa (RT).....	24
PCR en Tiempo Real: ADAMTS-5/18s.....	28
Inmunohistoquímica.....	31
Resultados.....	32
Localización de la ADAMTS-5 por Inmunohistoquímica.....	32
La ADAMTS-5 se encuentra sobre-expresada en pulmones con FPI.....	34
Discusión.....	36
Conclusión.....	37
Bibliografía.....	39

Abreviaturas

°C Grados centígrados

μl microlitro

aa amino ácido

Abs Absorbencia

ADAMTs Metaloproteinasas y desintegrinas con motivos de trombospondina

AEC Aminoetilcarbamida

cDNA Ácido Desoxirribonucleico complementario

DEPC Dietil-pirocarbonato

DNA Ácido Desoxirribonucleico

dNTP Desoxirribonucleotidos Trifosfato

EDTA Ácido Etilendiaminotetracético

EPID Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas

FPI Fibrosis Pulmonar Idiopática

IL Interleucina

INER Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

kDa kiloDalton

MEC Matriz Extracelular

MgCl₂ Cloruro de Magnesio

ml mililitro

mM milimolar

MMPs Metaloproteinasas de la Matriz

mRNA Ácido Ribonucleico mensajero

ng nanogramos

nm nanometros

OA Osteoartritis

PBS Buffer Salino de Fosfatos

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDGF Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

pb par de base

RNA Ácido Ribonucleico

rpm Revoluciones por minuto

RT-PCR Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa

TGF-β Factor de Crecimiento Transformante β

TIMPs Inhibidores de Metaloproteinasas

TNF Factor de Necrosis Tumoral

Resumen

La fibrosis pulmonar es el resultado final común de una serie de enfermedades pulmonares intersticiales, que abarcan varios tipos de daño pulmonar incluyendo los que resultan de la inhalación de polvo, partículas orgánicas (neumonitis por hipersensibilidad), inorgánicas (asbestosis), el uso de radiación y de algunos medicamentos quimioterapéuticos, como la bleomicina, o bien asociada a enfermedades colágeno vasculares como la esclerosis sistémica y la artritis reumatoide (AR) y de las enfermedades pulmonares intersticiales de la infancia. Entre ellas, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la forma más agresiva, que afecta predominantemente a individuos mayores de 50 años, siendo irreversible y habitualmente letal en un plazo corto de tiempo. Los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de la fibrosis pulmonar son complejos y no se conocen con precisión y recientemente se ha propuesto que las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) pueden seguir dos caminos celulares diferentes para el desarrollo de una respuesta fibrosante. En la FPI que representa la *vía epitelial*, las células del epitelio alveolar y bronquiolar aberrantemente estimuladas secretan las citocinas y factores de crecimiento responsables de la migración y proliferación de fibroblastos residentes, así como de progenitores circulantes (por ejemplo fibrocitos) y su transición a miofibroblastos. En los últimos años, diferentes estudios realizados en nuestro laboratorio han sugerido que las metaloproteasas de matriz (MMPs por sus siglas en inglés) desempeñan un papel fundamental en la remodelación aberrante que resulta en una exagerada acumulación de matriz extracelular (MEC) que involucra la expresión elevada de varias MMPs (11). Además de las MMPs, encontramos que algunas enzimas de la familia de las metaloproteasas y desintegrinas con motivos de trombospondinas (ADAMTS) están sobreexpresadas en la FPI (14). La familia ADAMTS son un grupo recientemente descrito, cuyos integrantes se han relacionado en procesos de degradación de la MEC, angiogénesis, homeostasis de la coagulación sanguínea, además

de presentar actividad de N-procolagenasa, ruptura de proteoglicanos como agregano, versicano y brevicano. La ADAMTS-5/ADAMTS-11 Agrecanasa 2 es una de las integrantes de esta familia más estudiada en patologías del cartílago, en especial en osteoartritis (OA) y AR. En estudios de FPI, mediante microarreglos se ha reportado que el gen *Adamts-5* aumenta su nivel de expresión. En este contexto, el objetivo de este estudio fue determinar por PCR en tiempo real la expresión de la ADAMTS-5 en tejidos de pulmón con FPI comparadas con pulmón normal (PN) y analizar por inmunohistoquímica la localización de la proteína. Los niveles de expresión de RNA de la ADAMTS-5 se analizaron en ocho tejidos con FPI y dos en PN. Los tejidos provenientes de pulmón con FPI claramente mostraron una expresión aumentada de la ADAMTS-5 comparada con PN. Esta proteína se localizó en células inflamatorias como macrófagos, y en células plásmaticas, por medio de inmunohistoquímica. Se requieren estudios para determinar el sustrato de esta enzima en pulmones con FPI para avanzar en el conocimiento sobre el papel que desempeña esta proteína en esta patología.

Introducción

Composición de la Matriz Extracelular del pulmón:

La matriz extracelular (MEC) es un complejo molecular altamente organizado. El arreglo de cada una de las moléculas que la forman y la interacción con los diferentes tipos celulares determinan la estructura, la información celular y el tipo de andamio que presentan los tejidos. La MEC además de participar en procesos de migración celular, provee principalmente, un ambiente biomecánico, en donde se lleva a cabo la comunicación e interacción a nivel celular o tisular, estableciendo la estructura y función de cada tejido. Las principales moléculas estructurales que la integran son las colágenas, proteoglicanos y glucoproteínas no colagénicas (1). Los proteoglicanos son moléculas cargadas, formadas por una proteína central a la que se unen covalentemente a una o más cadenas de glicosaminoglicanos. Los proteoglicanos se clasifican en tres familias: los proteoglicanos de agregados de condroitín sulfato o lecticanos, los proteoglicanos de condroitín sulfato ricos en leucina y los proteoglicanos heparán sulfato. Estas moléculas, participan en condiciones fisiológicas y patológicas de los tejidos (2).

Existe una relación entre la composición de la MEC y la función y anatomía del tejido. La MEC del cartílago; por ejemplo, se produce por los condrocitos y está constituida principalmente por dos componentes, el agrecano y la colágena tipo II, lo que permite a este tejido su alta capacidad de compresión y tensión. En estados patológicos, como la osteoartritis (OA), el principal detonante es la pérdida del agrecano, seguido de la degradación de las fibras de colágena y fallas mecánicas del tejido (3). El agrecano es uno de los componentes más importantes del cartílago. Pertenece a la familia de los lecticanos, que se caracterizan entre otros por tener la propiedad de interactuar con el ácido hialurónico en una forma específica, permitiendo la formación de agregados de peso molecular que resisten altas fuerzas de compresión (2). Constituye el 10% del peso seco

del cartílago; está formado por 3 dominios globulares, G1 que interactúa con el ácido hialurónico; G2 y G3 entre los cuales se encuentra el centro de la proteína, que es altamente sustituido con los glicosaminoglicanos (GAG) de carga negativa, como condroitín sulfato; resultando en la formación de una alta presión osmótica en el tejido, hidratando las fibras de colágena en el cartílago y brindando al tejido la propiedad de compresión y de resiliencia. (4).

Por otra parte, en el pulmón los proteoglicanos de la MEC proveen un soporte estructural. Recientemente se ha demostrado que también están involucrados en la homeostasis, en la reparación y en el desarrollo de este órgano; es por ello que desempeñan un papel muy importante tanto en condiciones normales, como en el desarrollo de diferentes patologías (2). Los proteoglicanos brindan una importante propiedad biomecánica al pulmón. Los GAG, por ejemplo; atraen cationes como el Na^+ , lo que permite formar una presión osmótica que al llenar el tejido de agua le brinda una capacidad de resistencia ante fuerzas de compresión. La elasticidad y la estabilidad alveolar, se da por la interacción de los proteoglicanos con otras moléculas de la MEC, como colágenas, laminina y elastina; formando matrices estructuradas (6). Las moléculas de la lámina basal interactúan directamente con las células epiteliales e incluyen los proteoglicanos de heparán sulfato, perlecano, agrina y colágena tipo XVIII, aunque la más abundante de las colágenas en la lámina basal es la tipo IV. Por otro lado, en el espacio intersticial se encuentran los condroitín sulfatos, versicano interactuando con el ácido hialurónico, permitiendo que los proteoglicanos se fijen en el tejido al formar agregados de alto peso molecular (2,7).

Fibrosis Pulmonar

La fibrosis pulmonar es el resultado final común de una serie de enfermedades pulmonares intersticiales, que abarcan varios tipos de daño pulmonar incluyendo los que resultan de la inhalación de polvo, partículas orgánicas (neumonitis por

hipersensibilidad), inorgánicas (asbestosis), el uso de radiación y de algunos medicamentos quimioterapéuticos, como la bleomicina, o bien asociada a enfermedades colágeno vasculares como la esclerosis sistémica, la artritis reumatoide (AR) y de las enfermedades pulmonares intersticiales de la infancia. Por otro lado, alrededor del 50% de los desórdenes pulmonares intersticiales son de etiología desconocida y se clasifican como neumonías intersticiales idiopáticas. Entre ellas, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la forma más agresiva, que afecta predominantemente a individuos mayores de 50 años, siendo irreversible y generalmente letal en un plazo corto de tiempo. De hecho se estima que la mitad de los pacientes con esta enfermedad mueren a dos a tres años después del diagnóstico (8).

Patogénesis de la Fibrosis Pulmonía Idiopática (FPI):

Los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de la fibrosis pulmonar no se conocen con precisión por lo complicado que resulta su estudio, aunque recientemente se ha propuesto que las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) pueden seguir dos vías diferentes para el desarrollo de una respuesta fibrosante (9, 10,11).

En la mayoría de las EPID la respuesta fibrótica se asocia a una inflamación pulmonar crónica no resuelta (*vía inflamatoria*). En esta vía inflamatoria, la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión desempeña un papel crítico en el inicio de la inflamación y posteriormente en el desarrollo de los mecanismos que llevan a la reacción fibrosante (11,12).

Por el contrario, la FPI, es una enfermedad progresiva, siendo irreversible y letal en corto plazo, representa un proceso fibrótico independiente de la inflamación, caracterizado por una comunicación anormal entre células epiteliales y mesenquimatosas (10, 11, 12, 13,14).

En la FPI que representa la *vía epitelial*, las células del epitelio alveolar y bronquiolar aberrantemente estimuladas secretan las citocinas y factores de crecimiento responsables

de la migración y proliferación de fibroblastos residentes, así como de células progenitoras circulantes (por ejemplo fibrocitos) y su transición a miofibroblastos.

En los últimos años, diferentes estudios realizados en nuestro laboratorio han sugerido que las metaloproteasas de matriz (MMPs por sus siglas en inglés) desempeñan un papel fundamental en la remodelación aberrante resultando en una exacerbada acumulación de MEC que involucra la expresión elevada de varias MMPs (12). Se ha reportado que estas proteínas además de participar en la degradación de la MEC, también participan en la liberación de factores de crecimiento, influyendo biológica y patológicamente en procesos como el desarrollo embrionario, morfogénesis y reparación de tejidos (15).

Además de las MMPs, encontramos en estudios por microarreglos que algunos genes de enzimas de la familia de las metaloproteasas y desintegrinas con motivos de trombospondinas (ADAMTS) se sobreexpresan en la FPI (16).

Metaloproteasas y desintegrinas con motivos de trombospondinas (ADAMTS):

Las ADAMTS son una familia de proteasas representada por más de 20 miembros (Fig. 1) (17). Pertenece a la familia M12 de las metaloendopetidinas, por su similitud con el dominio de metaloproteasa, y a la subfamilia M12B de las Adamalinas (18). Las ADAMTS son enzimas extracelulares que poseen multidominios, además de motivos de trombospondinas tipo 1 (TS) (19).

La familia de trombospondinas, incluye cinco miembros que se caracterizan por una organización modular específica. La primer integrante descrita de esta familia, fue la trombospondina 1 (TSP1), la cual es una glicoproteína extracelular, que fue reconocida primeramente como un inhibidor de la angiogénesis, sin embargo; estudios más recientes

revelan una habilidad como regulador del crecimiento vascular en distintos modelos de angiogénesis. Su estructura incluye un motivo globular N- terminal, una región homologa a las de las pro-colagénas, tres repeticiones “trombospondina” o dominios tipo properdina (TSR), tres repeticiones tipo 2 o EGF, cinco sitios de unión a calcio o repeticiones tipo 3; y un dominio globular C-terminal. (20).

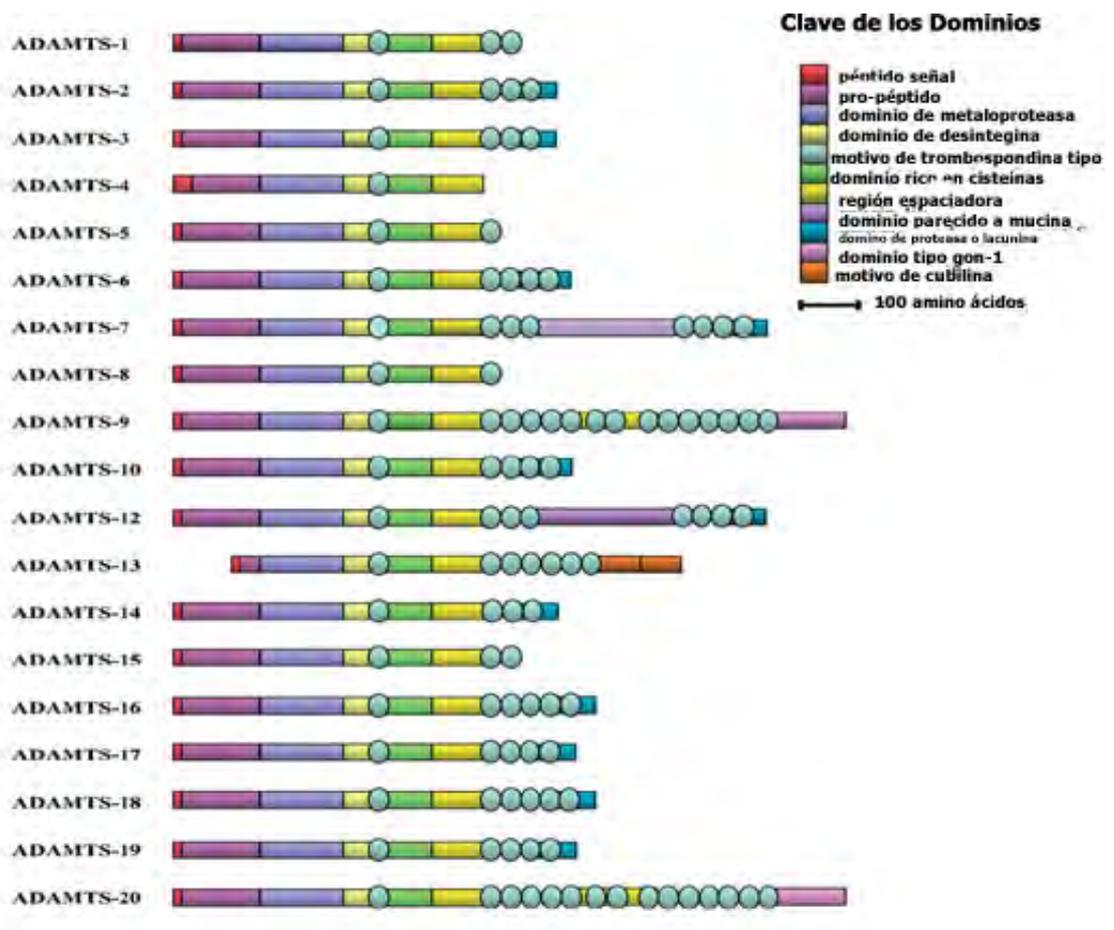


Fig 1: Estructura de los dominios de la familia ADAMTS: Las proteínas de la familia ADAMTS cuentan con un péptido señal, un prodominio, un sitio catalítico, un dominio rico en cisteína, una región espaciadora y uno o más motivos de trombospondina (Tomado de Porter *et al.*, 2005)

Las ADAMTs al igual que las MMPs son inhibidas por los TIMPs o inhibidores de la matriz (4).

Las tres familias ADAMTs, ADAMs y MMPs, muestran sitios conservados en la composición de aminoácidos del dominio catalítico (Fig. 2 y 3).

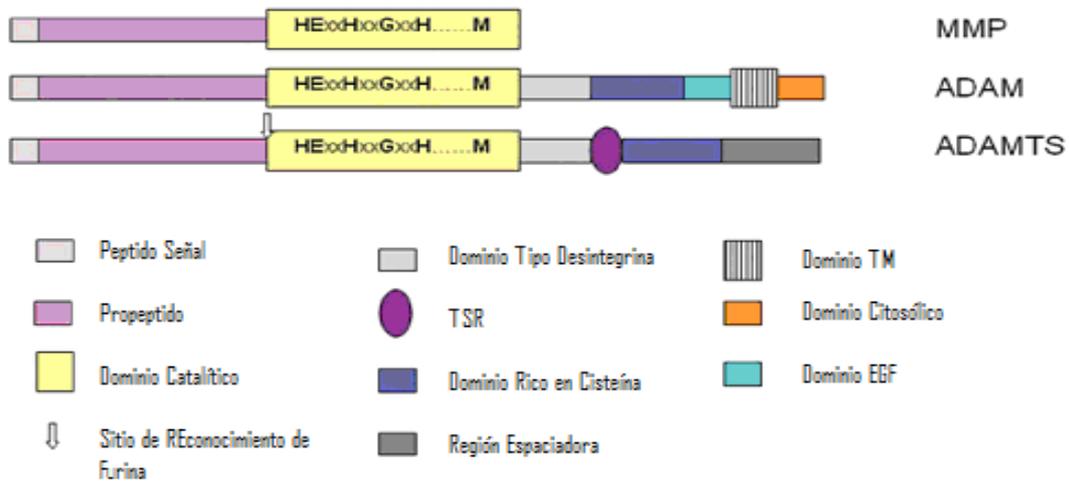


Fig. 2 Comparación de los sitios conservados en el dominio catalítico de las MMP, ADAMTS y ADAM: Donde se muestra la secuencia consenso que caracteriza a la familia (Jones y Riley, 2005)

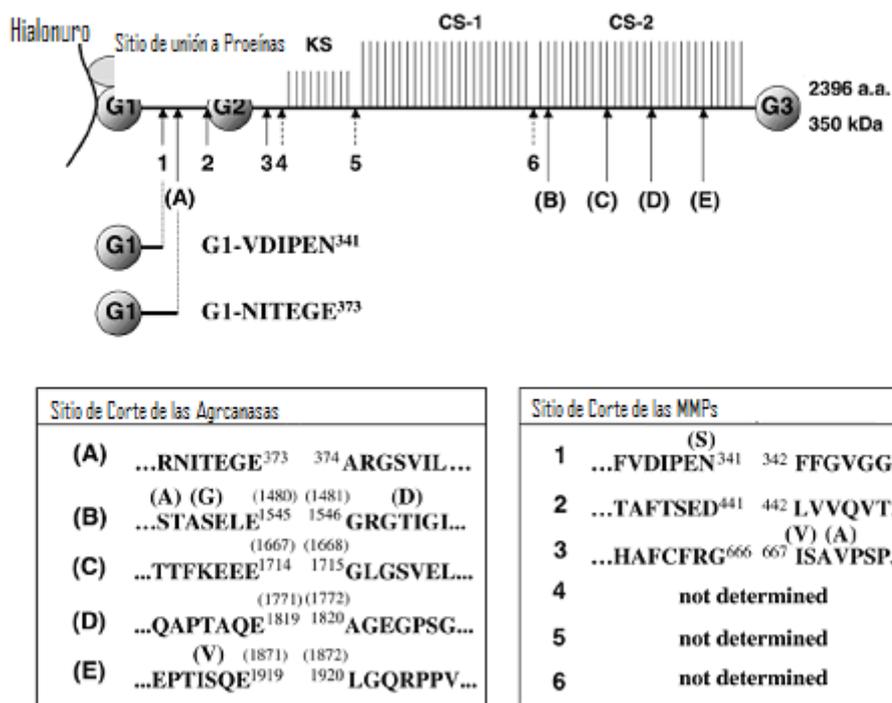


Fig. 3 Vista esquemática de los sitios de corte en el Agrecan por MMPs y ADAMTS: Mostrando la diferencia que existe en el tipo de corte de cada proteasa (Nagase y Kashiwagi, 2003)

El papel que tienen los diferentes miembros de la familia ADAMTS es variado, y en algunos es todavía incierto (Tabla 1). La ADAMTS-1, por ejemplo, es una proteína

soluble, contienen un motivo TSP-1 con segmentos de secuencia similares en las trombospondina 1 y 2. La secuencia, W(S/G)XW está también implicada con la interacción de la trombospondina con la heparina, sulfato de heparina y el condroitín sulfato, mientras que la CSVTCG con la unión al receptor de trombospondina, CD36 (4). La ADAMTS-1, se incorpora a la MEC después de su secreción y es activada durante la misma al ser removido el propeptido en un corte de furina, y junto con la ADAMTS-8 presentan una alta propiedad anti-angiogénica (19).

Dentro del grupo de las ADAMTS, la ADAMTS-4 junto con la ADAMTS-5 están expresadas en cartílagos humanos normales y en casos con osteoartritis OA sinovial, (21,22,23) contribuyendo con el daño estructural característico de la patología (24). Se ha reportado además que ambas proteasas comparten 48% de identidad en su secuencia fuera del pro y predominio, su sitio activo en cada una posee residuos conservados que permite asumir una configuración virtual idéntica entre uno y otro. Sin embargo, difieren en cuatro aminoácidos (Ala²⁵², Val³⁹⁰, Met³⁹⁵ y Val³⁹⁸, que son en la ADAMTS-5 reemplazados por Leu³⁰¹, Leu⁴³⁸, Leu⁴⁴³ e Ile⁴⁴⁶ (3) y que en la ADAMTS-4 el dominio no-catalítico de la proteína influye en su actividad proteolítica y en su interacción con la MEC. El dominio espaciador es determinante en la localización de la ADAMTS-4 en la matriz, como lo es el dominio rico en cisteína para la ADAMTS-5. (25,26)

Las ADAMTS son proteasas que están implicadas en un gran número de procesos de degradación de la MEC en el pulmón (21) Sin embargo, se ha puesto una atención considerable en la ADAMTS-5 debido a que en recientes estudios realizados por el grupo de los Drs. Pardo y Selman, donde encontraron a través del análisis de la expresión génica mediante microarreglos, que esta proteasa aumenta su expresión en pacientes con FPI (16).

La estructura general de las proteínas ADAMTS se caracteriza por la presencia de cuatro dominios estructurales y funcionales: un predominio N-terminal, un dominio catalítico, un dominio de desintegrina, y el dominio de unión a la MEC que contiene uno o más motivos de TS, un dominio rico en cisteína y un dominio separador de tamaño variable, además del carboxilo terminal (17,21,27).

Familia ADAMTS:

Nombre del Gen	Localización cromosómica	Nombre de la Proteína	Nombres alternativos	Sustratos conocidos
<i>ADAMTS1</i>	21q21	ADAMTS-1	METH-1-Agrecanasa 3	Agrecan, Versican V1
<i>ADAMTS2</i>	5q35	ADAMTS-2	PCINP	Procolágena I, II y III N-propeptidos
<i>ADAMTS3</i>	4q21	ADAMTS-3	KIAA0366	Procolágena-II N-propetido
<i>ADAMTS4</i>	1q23	ADAMTS-4	Agrecanasa 1, KIAA0688	Ahuecan, brevican, versican V1, fibromodulina, modulina, decorina; carboximetil transferina.
<i>ADAMTS5</i>	21q21	ADAMTS-5	Agrecanasa 2, ADAMTS-11	Agrecan, decorita, biglicano, fibronectina; gelatina.*
<i>ADAMTS6</i>	5q12	ADAMTS-6		
<i>ADAMTS7</i>	15q24	ADAMTS-7		
<i>ADAMTS8</i>	11q25	ADAMTS-8	METH-2	
<i>ADAMTS9</i>	3p14	ADAMTS-9	KIAA1312	Agrecan, versican
<i>ADAMTS10</i>	19p13	ADAMTS-10		Von Willebrand factor

<i>ADAMTS12</i>	5q35	ADAMTS-12		Procolágena-I N-propetido
<i>ADAMTS13</i>	9q34	ADAMTS-13	vWFCP	
<i>ADAMTS14</i>	10q21	ADAMTS-14		
<i>ADAMTS15</i>	11q25	ADAMTS-15		Agrecan
<i>ADAMTS16</i>	5p15	ADAMTS-16		
<i>ADAMTS17</i>	15q24	ADAMTS-17		
<i>ADAMTS18</i>	16q23	ADAMTS-18		
<i>ADAMTS19</i>	5q31	ADAMTS-19		
<i>ADAMTS20</i>	12q12	ADAMTS-20		

Tabla 1. Tabla de la clasificación de los integrantes de la Familia ADAMTS (Adaptación de la propuesta por: Porter *et al.*, 2005); *(Pardo *et al.*, 2007)

ADAMTS-5/ADAMTS-11, Agrecanasa 2.

La ADAMTS-5, ADAMTS-11 o Agrecanasa 2, es una de las proteasas más pequeñas que incluye la familia ADAMTS, contando únicamente con dos motivos TSP (27). Presenta el motivo consenso HEXXHXXGXXH, cuyos tres residuos de histidina están relacionados en la unión del ión de zinc esencial para el sitio catalítico, característica de la superfamilia de las metzincinas. Su dominio de desintegrina carece de la secuencia básica de unión a integrina (RGD) y por lo tanto no interactúa con estas proteínas, pero en su sitio catalítico posee además del sitio de unión a zinc, dos sitios críticos de unión a calcio, los cuales mantienen la integridad de la proteína. (27, 28)

Está localizada en el cromosoma 21q21 en humanos, y es liberada al exterior de la célula como un zimógeno que se activa cuando se corta el predominio por furinas y enzimas tipo-furina. El sitio de corte predicho es a R²⁶²263S, detectado *in vitro*, aunque aún no se sabe si también sea *in vivo* (29,30). Su secuencia completa codifica para 930 aminoácidos, con una masa predicha en 101.715 kDa y de 73.169 kDa la forma madura al ser secretada. En ratón y en humanos, el predominio de la ADAMTS-5 cuenta con tres sitios de

reconocimiento potenciales de furina alrededor de una secuencia multibásica ²⁵⁸ RRRRR ²⁶² . (28,31). Como agrecanasa, corta en los sitios de unión Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ así como en el sitio Asn³⁴¹-Phe³⁴² del dominio interglobular (IGD) del agrecano (4). Degrada además brevicano,, uno de los proteoglicanos más importantes en el tejido cerebral (32) y la macroglobulina- α (25,32,33).

La ADAMTS-5 es una molécula que se expresa en ambas formas, constitutivamente y de forma inducible, dependiendo de la especie, del tipo celular o de las condiciones experimentales que se manejen (30,33), se expresa en forma constitutiva en condrocitos humanos y en fibroblastos sinoviales (30). Está presente en órganos como corazón, pulmón, útero, ovarios, cerebro y cartílago. Se ha estudiado su participación en los procesos de la remodelación/degeneración del cartílago en casos de OA y AR principalmente. (5). Su expresión durante procesos de embriogénesis así como en tejidos adultos se ha considerado también de gran interés (23), como en los procesos de fertilidad, ya que está involucrada en la degradación del endometrio en humanos (18).

Características y función

La ADAMTS-5 es la agrecanasa más importante en el metabolismo del cartílago normal, así como en procesos patológicos y a diferencia de la ADAMTS- 4 su caracterización bioquímica no está terminada (26). Además es la agrecanasa responsable primaria en la degradación del agrecano en modelos de ratón OA, y puede ser una opción en la intervención terapéutica de esta enfermedad (34).

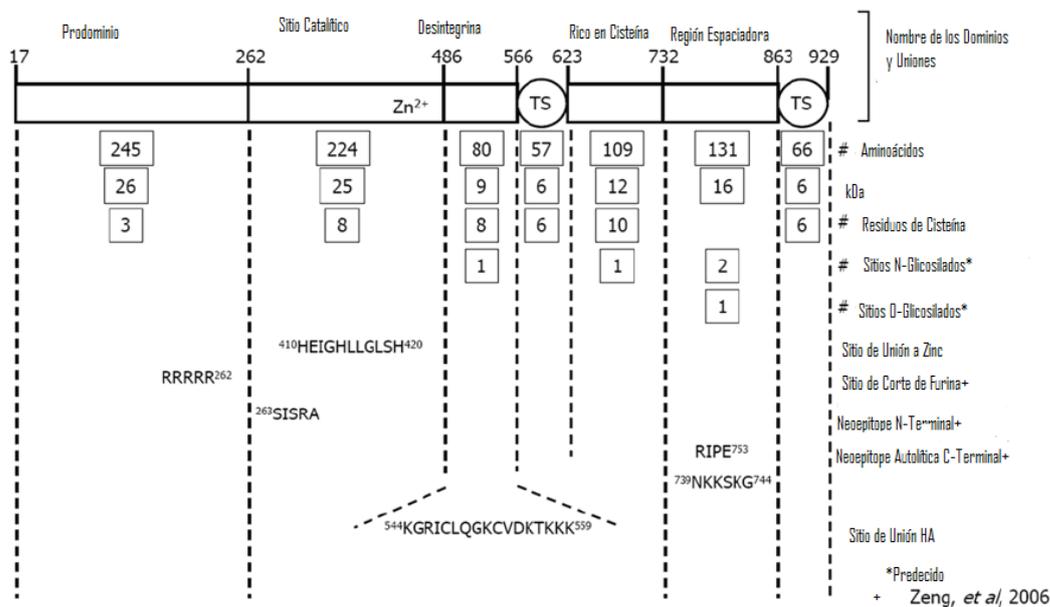


Fig. 4 Vista esquemática de los dominios que forman a la ADAMTS-5: Cuenta con un prodominio, sitio catalítico, un dominio de desintegrina, un dominio rico en cisteína, una región espaciadora y dos motivos de trombospondina. (Tomado de Fosang *et al.*, 2008)

Activación y regulación

La ADAMTS-5 se sintetiza como un zimógeno inactivo, que adquiere su actividad catalítica al remover su prodominio por furinas. El sitio N-terminal de la proteasa madura, sugiere que esta activación puede estar dada por una convertasa. El recombinante de la convertasa PACE4 remueve el prodominio de la proADAMTS-5 *in vitro*, exponiendo el nuevo sitio N-terminal ²⁶²SISR de la ADAMTS-5 activa (35).

La regulación de la expresión de la ADAMTS-5 está dada por agentes catabólicos como IL-1 α y β , Oncostantina M, TNF α y ácido retinóico. Mientras que su actividad es inhibida por inhibidores endógenos de MMPs, TIMP-1,2,3 y 4 pero más eficientemente por TIMP-3. Recientemente se ha encontrado que la α_2 – macroglobulina es un nuevo sustrato para la ADAMTS-5, así como un inhibidor endógeno, cuya actividad esta mediada por la proteólisis de la región de anclaje de la proteína, resultando en un entrapamiento físico de la misma (33,36).

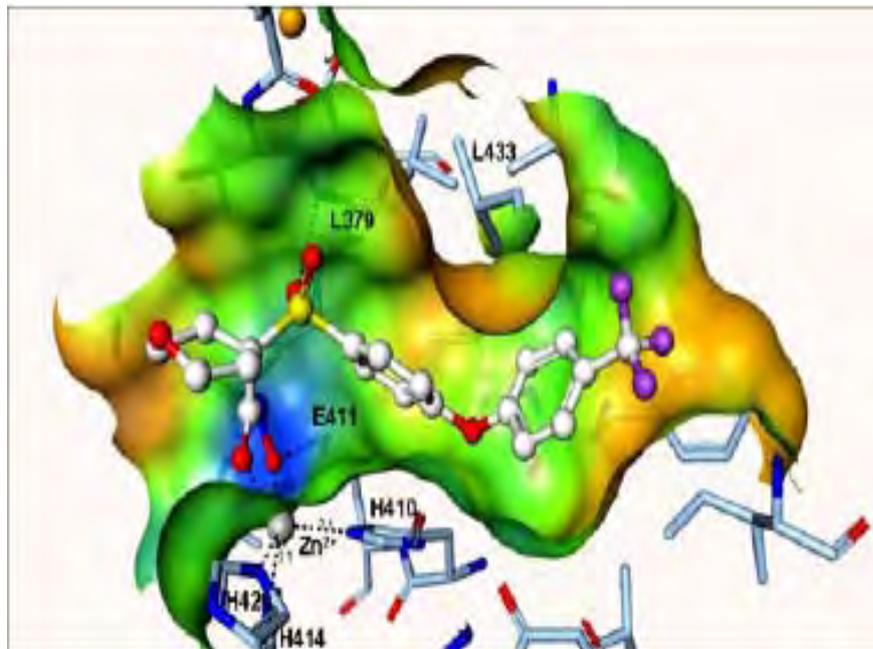


Fig 5 Sitio catalítico de la ADAMTS-5. Tienen una forma de embudo, que se abre en el sitio de Zinc y canales en el otro extremo, brindando tres sitios de interacción entre el inhibidor y la proteína. (Tomado de Shieh, et. al. 2007).

Los dominios auxiliares que regulan la afinidad de las proteasas a sus sustratos son conocidos como “exositos”, los motivos de TS, el dominio rico en cisteína y el dominio espaciador actúan como exositos en la ADAMTS-5, por ejemplo, la interacción de la ADAMTS-5 con el ácido hialurónico podría ser mediada a través del dominio de desintegrina, el cual contiene un par de sitios de unión a este.(30,37,38).

Se ha encontrado, que la hormona tri-iodotironina T3, puede incrementar la expresión del mRNA de la ADAMTS-5, en cultivos de condrocitos de conejo, también estados de hipertrófia durante la osificación endocondrial, sugiriendo que la ADAMTS-5 puede estar involucrada en la degradación del agregano durante la osificación endocondrial (39).

Uno de los procesos más importantes en la regulación de la actividad como agreganasa en la familia ADAMTS, son los cambios postraduccionales. No se ha reportado que la ADAMTS-5 posea splicing alternativo, el cual en la ADAMTS-4 provee un regulador potencial de la actividad en esta proteasa. El mínimo de dominios necesarios en la ADAMTS-4 y ADAMTS-5 para mantener su actividad de degradación del agregano son: un dominio catalítico, un dominio de desintegrina y el primer motivo TS (29). Por otra parte, la supresión del dominio espaciador en la ADAMTS-5 disminuye la actividad de agreganasa en el dominio interterglobular (IGD) del agregano, a diferencia de la ADAMTS-4 en donde la incrementa su actividad IGD (25,40).

El inhibidor natural de la ADAMTS-5 reportado es TIMP-3, el cual bloquea el péptido de corte de forma dependiente de la concentración (35). Pero se especula que la TSP 1 podría ser también un inhibidor endógeno (4).

Ratón genéticamente modificado carente del gen de la ADAMTS-5 (ADAMTS-5 KO)

En modelos de ratón carentes del gen ADAMTS-5, no se presenta diferencia en el fenotipo catalítico comparado con ratones silvestres, sin embargo en modelos de ratón con OA inducida quirúrgicamente, los carentes del gen de la ADAMTS-5 presentan una protección en la degradación del cartílago (34). De forma comparable, se ha encontrado en modelos carentes de los genes ADAMTS-4 y 5, que son fenotípicamente normales,

comparados con ratones normales, y que poseen una protección contra la degradación de proteoglicanos ex vivo, disminuyendo la severidad de OA en ratones (41).

ADAMTS-5 en FPI.

Si bien, la ADAMTS-5 ha sido altamente descrita en patologías relacionadas con la remodelación/degradación de la MEC, como son la OA y la AR (29). En las cuales se ha descrito que posee un papel en la degradación del agregán, que seguido de la degradación de las fibras de colágenas llevan a la pérdida del cartílago (30). En patologías del pulmón, y en específico en la FPI se desconoce aún el papel de esta proteasa (16) (Tabla 2)

	Localización de la Proteína	Posible Función en FPI
<i>Familia M10</i>		
MMPs		
Matrisinas		
MMP-1, Colagenasa-1, Colagenasa Intersticial	Células Epiteliales Alveolares, Macrofagos Alveolares	Migración y proliferación de Células Epiteliales
MMP-2, Gelatinasa A	Células epiteliales bronquiolares y alveolares, células mesénquimales en focos de Fibroblastos	Degradación de la membrana basal
MMP-7, Matrilisina	Células epiteliales alveolares, Macrofagos alveolares, MEC.	Inactivación de citocinas de proliferación, activación de mediadores profibróticos y proinflamatorios
MMP-9, Gelatinasa B	Células epiteliales alveolares	Degradación de la membrana basal, aceleración del fenotipo

		típico de FPI
MMP-28, Epilisina	Desconocido	Transición Epitelio-Mesénquima
<i>Familia M12</i>		
ADAMs, Ancladas a la membrana, ADAM 15, Metargidina, MDC15,AD56	Desconocido	Desconocido
CR-II7, ADAM8	Desconocido	Desconocido, aumentado en FPI vs HP
ADAMTS Tipo secreción, ADAMTS5, ADAMTS 11, Agrecanasa 2, ADMP-2	Células inflamatorias intersticiales y Fibroblastos	Desconocido
ADAMTS9, KIAA1312	Células intersticiales y epiteliales	Desconocido
BMP1, procolagenasa C-peptidasa	Desconocido	Proceso de procologénolisis de colagenasas fibrilares

Tabla 2. Localización y posible papel de algunos integrantes de la familia M10 y M12 en FPI (Adaptación de Pardo, et. Al. 2008)

Objetivo

Por análisis de microarreglos se observó que la firma transcripcional de FPI muestra un aumento en la expresión de ADAMTS-5 (16). En este contexto, el objetivo de este estudio es determinar por PCR en tiempo real la expresión de la ADAMTS-5 en tejidos de pulmón con FPI comparadas con pulmón normal y analizar por inmunohistoquímica la localización de la proteína.

Hipótesis

La FPI, es una patología que recientemente se ha demostrado sigue un camino alterno a la vía inflamatoria (9), desarrollándose como resultado de una activación aberrante de las

células epiteliales tras un daño, el cual es desconocido. Se ha propuesto que este daño puede ser ocasionado no sólo por uno, sino por distintos mecanismos a la vez, como virus, humo de tabaco y otros posibles agentes causantes de daño, provocando una inapropiada re-epitalización del tejido, y una constante degradación y remodelación de la MEC (12). En este sentido y basándome en estudios anteriores realizados en este laboratorio, en los que se analizó la expresión génica mediante microarreglos de la FPI, el gen de la proteasa ADAMTS-5 estaba elevado, la hipótesis de este trabajo es encontrar más elevado los niveles de expresión del mRNA de la ADAMTS-5 en tejidos de pulmón con FPI comparados con PN por medio de PCR en Tiempo Real, y que su localización inmunohistoquímica sea en células del tejido conjuntivo, como fibroblastos y células inflamatorias, como macrófago; basándome en su producción por células como condrocitos y fibroblastos sinoviales en patologías relacionadas con la degradación de la MEC, como son la OA y AR (23,24,25).

Métodos

Población de estudio

Se trabajó con 8 muestras de ácido ribonucleico (RNA) total de tejidos de pulmón de pacientes con FPI obtenidas de biopsias utilizadas para diagnóstico y bajo protocolo aprobado por el comité de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), una de pulmón “normal” obtenida por lobectomía para la resección de un tumor primario de pulmón de áreas sin evidencia histológica de enfermedad. Además se utilizó también como control una muestra de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) comercial (Ambión, USA).

Síntesis de cDNA por Transcriptasa Reversa (RT).

Para evaluar el transcrito de la ADAMTS-5, se utilizó la técnica de retrotranscripción, a partir de RNA de cadena sencilla se obtuvo el cDNA de doble hebra, utilizando la enzima Transcriptasa Reversa.

En un tubo estéril se colocó 1µg de RNA (Cada una de las muestras trabajadas de RNA se cuantificó con ayuda de un espectrofotómetro: NanoDrop 2000, Thermo scientific) y se le agregó DNasa (1U/µl) (Life Technologies, Grand Island, NY) para eliminar cualquier posible contaminación con DNA genómico; amortiguador 10x propio del kit y agua DEPC según las instrucciones del fabricante. Para que se lleve a cabo la reacción se dejó a 37°C durante 30 minutos y se agregó posteriormente EDTA a cada tubo para detener la actividad de la DNasa, incubando a 65°C durante 10 minutos.

Para la reacción de RT-PCR, se agregó Hexameros al azar, se incubó durante 2 minutos a 70°C y se pasó inmediatamente a hielo. Se agregó la mezcla de reacción del kit (Clontech, California, USA) con los siguientes reactivos según los volúmenes indicados:

Mezcla de RT

	1x
Buffer reacción 5x	4 µl
dNTP mix (10mM)	1 µl
Inhibidor de RNasa recombinante (1U/µl)	0.5 µl
MMLV Transcriptasa reversa	1 µl

Se mezcló por inversión y se centrifugó en la microcentrifuga. Se dejó incubando 1 hora a 42°C y posteriormente 5 minutos a 94°C.

Finalmente se agregó agua dietil-pirocarbonato (DEPC) para llevar cada tubo de reacción a un volumen final de 100 µl.

PCR

Se amplificó el cDNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con oligonucleotidos específicos (Invitrogen) en un termociclador (Perkin Elmer, PCR System 2400).

Las secuencias transcrita utilizadas en este trabajo se obtuvieron de la secuencia de la ADAMTS-5 con referencia del Centro Nacional de Información Biológica (NCBI). La secuencia fue diseñada utilizando un software de diseño (Primer 3). Obteniendo una secuencia iniciadora específica para la ADAMTS-5 (NM007038 en el NCBI) de 100pb (Tabla 3) diseñada por Applied Biosystems, ajustando las diferencias en la cantidad de RNA total en cada muestra.

cDNA	Secuencia (5' → 3') S= sentido; A= anti-sentido
ADAMTS-5	S=ATATGCAGGTGTCCTGCCAGCG A=AGTGCCATCGGTCACCTTTGGAG

Tabla 3 Secuencia iniciadora utilizada para la amplificación del cDNA de mRNA de tejido de pulmón humano por SYBR Green PCR.

Para amplificar el producto del gen de la ADAMTS—5 y el del gen 18s, el cual se utilizó como control en la reacción, se realizó una PCR convencional trabajando por triplicado, utilizando dichos primers específicos para el mensajero del gen ADAMTS-5, en mRNA de una línea de fibroblastos de pulmón normal (N13) obtenida en el laboratorio, en pasaje 10 de las líneas celulares. Para poder establecer las condiciones de amplificación y realizar las curvas estándar necesarias en la reacción de PCR Tiempo Real.

Mezcla	1x (µl)
MgCl ₂ (25mM)	0.6
Buffer 10x	1.5
dNTP's (2µM)	1
P. ADAMTS-5 sentido (10µM)	1.5
P. ADAMTS-5 antisentido (10µM)	1.5
Agua DEPC	15.5
Taq Platinum (5U/µl)	0.15
Total	13

Tabla 4. Mezcla de reactivos utilizada para la PCR convencional para el gen de la ADAMTS-5

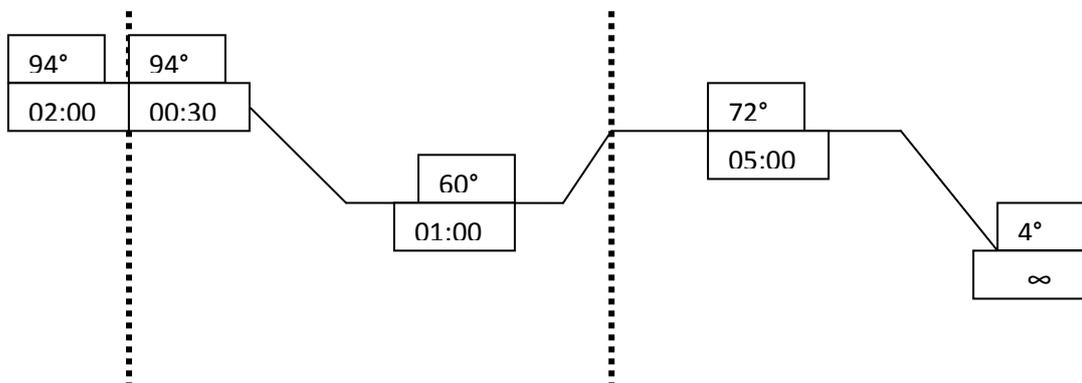
A cada uno de los tubos se les agregó 23µl de la mezcla más 2µl de muestra, realizándolo por triplicado.

Tubo	Mezcla anterior	Muestra	Total
1	13 µl	2 µl N13 P-10	15 µl
2	13 µl	2 µl N13 P-10	15 µl
3	13 µl	2 µl N13 P-10	15 µl
4	13 µl	2 µl N13 P-10	15 µl
5	13 µl	2 µl N13 P-10	15 µl
6	13 µl	2 µl N13 P-10	15 µl

7	13 μ l	2 μ l Agua DEPC	15 μ l
---	------------	---------------------	------------

Tabla 5. Mezcla final de los reactivos para la PCR.

Condiciones de PCR 40 ciclos de 2 tiempos.



Se preparó un gel de agarosa al 1.5% para corroborar que los tamaños de los productos de la PCR fueran los esperados y se extrajeron las bandas de los productos*.

Los productos obtenidos fueron purificados en columnas siguiendo las recomendaciones del fabricante:

1. Depositar las bandas del gel sobre las columnas de purificación
2. Centrifugar a 7,500g durante 10 minutos a Temperatura Ambiente
3. Cuantificar el cDNA en un NanoDrop 2000, Thermo scientific, leyendo a 260nm

Cálculos para las diluciones:

$$\text{Producto de PCR} : 8.5\text{ng}/\mu\text{l} = 8.5 \times 10^{-9} \text{ g}/\mu\text{l}$$

$$\text{Tamaño del producto esperado (100pb)} \times (622\text{da}) = 62,000 \text{ g/mol}$$

$$(62,000 \text{ g/mol}) / (6.022 \times 10^{23} \text{ #copias/mol}) = 1.032 \times 10^{-19} \text{ g/#copias}$$

Copias de cDNA obtenido:

$$(8.5 \times 10^{-9} \text{ g}/\mu\text{l}) / (1.032 \times 10^{-19} \text{ g/#copias}) = 8.23 \times 10^{10} \text{ #copias}/\mu\text{l}$$

Se tomó la cantidad necesaria para preparar 50µl de muestra a una concentración de 0.5×10^{10} #copias/ µl y se realizó una serie de diluciones con las siguientes concentraciones

Tubo	Concentración de la Muestra
1	0.5×10^{10} #copias/ µl
2	0.5×10^9 #copias/ µl
3	0.5×10^8 #copias/ µl
4	0.5×10^7 #copias/ µl
5	0.5×10^6 #copias/ µl
6	0.5×10^5 #copias/ µl
7	0.5×10^4 #copias/ µl
8	0.5×10^3 #copias/ µl
9	0.5×10^2 #copias/ µl

Tabla 6. Diluciones de la cantidad de producto de PCR de ADAMTS-5 obtenido mediante la PCR convencional.

Los tubos se mantuvieron a -20°C y después se utilizaron en la elaboración de la curva estándar de la PCR para el gen ADAMTS-5.

*Nota: Los productos obtenidos fueron secuenciados para comprobar que correspondían a la ADAMTS-5.

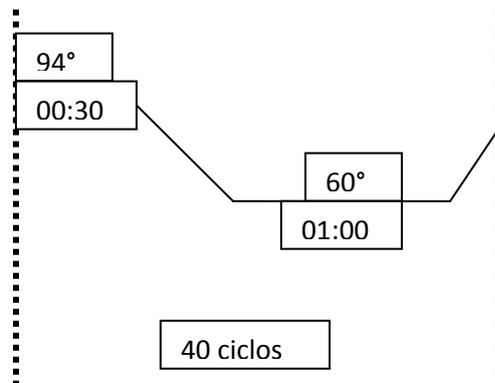
PCR en Tiempo Real: ADAMTS-5/18s

Se elaboraron curvas estándar, trabajando cada muestra por triplicado. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Bio Rad, modelo iCycler iQ multicolor Real-Time PCR Detection System). Se toman 2µl de cada tubo de la serie de diluciones anterior y de las muestras de mRNA de la población en estudio y se le agregan a la mezcla mostrada en la siguiente tabla.

1. Se coloca en el termociclador para tiempo real bajo las siguientes condiciones:

Reactivos	1x (μ l)
MgCl ₂ (50mM)	0.6
Buffer 10x	1.5
dNTP's (2 μ m)	1
P. ADAMTS-5 sense (10 μ M)	1.5
P. ADAMTS-5 antisense (10 μ M)	1.5
Agua DEPC	4.95
Taq Platinum (5U/ μ l)	0.15
SyBr GREEN 10x	1.5
Fluoresceina 500nM	0.3
TOTAL	13 μ l

Tabla 7. Mezcla de reactivos para la curva estándar para el gen ADAMTS-5 en PCR en Tiempo Real.



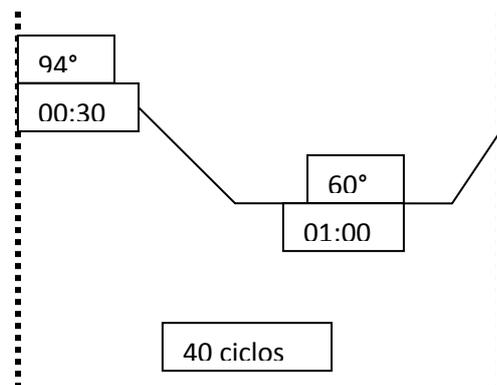
Los datos obtenidos se reservan para el análisis contra el RNAr 18s tomado como gen constitutivo.

El ensayo de PCR en Tiempo Real para el gen 18s se llevó a cabo por triplicado utilizando una sonda TaqMan™. Cada tubo de reacción contenía 13µl de mezcla y 2µl de muestra (dilución 1:100):

Mezcla	1x (µl)
MgCl ₂ (25mM)	0.6
Buffer 10x	1.5
dNTP's (2µm)	1
Sonda TaqMan™	0.15
Agua DEPC	9.6
Taq Platinum (5U/µl)	0.15
TOTAL	13 µl

Tabla 8. Mezcla de reactivos utilizados para la curva estándar del gen 18s mediante PCR en Tiempo Real.

Se coloca en el termociclador para tiempo real bajo las siguientes condiciones:



Para comprobar que el ensayo estuviera dentro de los límites correctos ($R^2 = 0.993$) se hizo una curva estándar para cada triplicado.

Se calculó la concentración de RNA total, dividiendo la cantidad obtenida para el gen de la ADAMTS-5 entre la del gen constitutivo 18s para cada muestra. Dado que un gen se puede expresar menos que un gen constitutivo (valor negativo), o estar sobreexpresado (valor positivo).

Inmunohistoquímica

Para llevar a cabo la reacción de tinción inmunohistoquímica, los tejidos utilizados fueron desparafinados con Xilol durante 25 minutos, posteriormente se rehidrataron en un tren de alcoholes con etanol absoluto, al 95% y 50% durante 5 minutos cada uno de ellos y mantuvieron 10 minutos en agua estéril y desionizada.

Se incubaron durante 30 minutos en Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 3% en metanol y se lavaron en PBS 1x durante 5 minutos. Para realizar la recuperación antigénica se colocaron las laminillas en un buffer de citratos (0.01M ácido cítrico pH=6) y llevando a ebullición con ayuda de un horno de microondas a máxima potencia durante 4 minutos; se baja la potencia a nivel 3 y se deja durante 4 minutos más. Se dejó enfriar durante 25 minutos en charola con agua de la llave y se lava nuevamente con PBS 1x durante 5 minutos.

Se adicionó un bloqueador universal (Biogenex 1x) con agua estéril y desionizada (Biogenex) por 10 minutos y se lava una vez más con PBS 1x 5 minutos. Se realiza un segundo bloqueo con suero normal de borrego (Chemicon) en una dilución de 1: 100 en PBS 1x durante 30 minutos, dejando los controles negativos en este suero.

Las muestras experimentales fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-ADAMTS-5 (Rabbit antibody ADAMTS-5, Triple Point Biologics,) a una dilución de 1:200 en un

diluyente comercial (Biomed) con BSA (Albúmina Sérica Bovina) al 1% manteniendo a 4° C durante toda la noche en una cámara oscura.

Al día siguiente se da dos lavadas de 5 minutos cada una con PBS 1x con Tween al 0.1% (PBST 1x) y se incuba con un segundo anticuerpo (Super sensitive detection system, Multilink de Biogenex) 20 minutos y se da otra lavada de 5 minutos con PBS 1x con Tween al 0.1%.

Se incuban con Estreptavidina conjugada con peroxidasa (Biogenex multilink) durante 20 minutos lavando posteriormente con PBST 1x 5 minutos. Se reveló con una peroxidasa con Aminoetilcarbamida (AEC) de Biogenex, parando la reacción calorimétrica con agua y contratiñendo con Hematoxilina (Biogenex) 10 segundos. Posteriormente se coloca una capa de Crystal-mount (Biomed) y se deja secar en el horno durante 15 minutos para fijar finalmente con resina (Biomed) y colocar el cubreobjetos.

Resultados

Localización de la ADAMTS-5 por Inmunohistoquímica

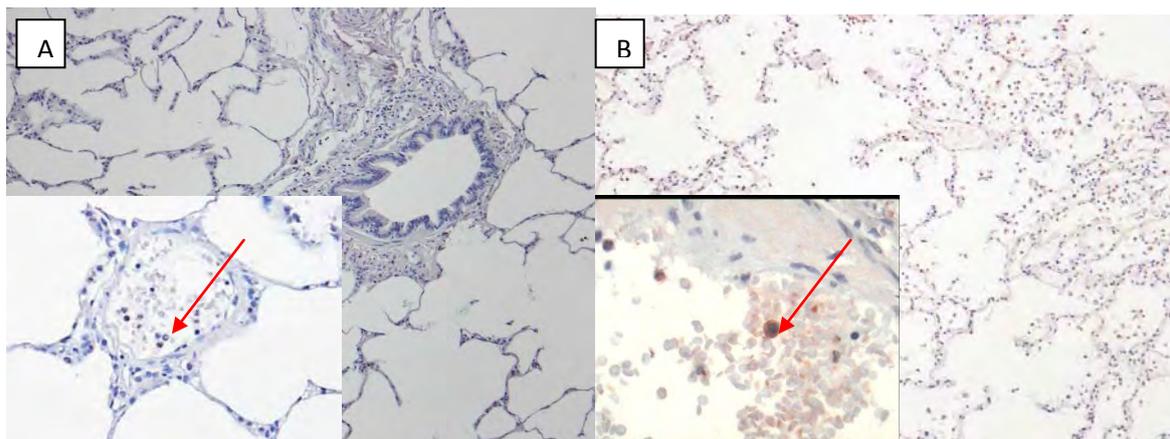
Para la técnica de inmunohistoquímica, se trabajó con un anticuerpo contra la ADAMTS-5, elaborado con péptidos sintéticos basados en el carboxilo terminal de esta agrecanasa en humanos.

En el caso de pulmón normal la proteína inmunoreactiva se observó en muy pocas células entre ellas, algunos macrófagos, y células cebadas (Figura 8 paneles A y B). Las células se identificaron en base a su morfología. Los macrófagos son células, que generalmente grandes, de forma irregular, con un núcleo en forma de riñón (42). Las células cebadas son redondas, contienen un núcleo ovalar y en su citoplasma poseen gránulos secretores de

histamina, los cuales morfológicamente se aprecian como un cumulo de gránulos metacromáticos (43). Para una determinación más precisa es necesario realizar una tinción con triptasa como marcador para células cebadas y un anticuerpo de ratón para macrófagos humanos (Abcam).

Los tejidos de pulmón con fibrosis pulmonar idiopática mostraron tinción positiva para ADAMTS-5 en las regiones alrededor del espacio aéreo específicamente en las zonas internas del espacio bronquial. Además, la enzima inmunoreactiva se observó claramente con una tinción muy intensa en células plasmáticas, y células inflamatorias como macrófagos. (Figura 8 recuadros C y D).

El control negativo, contó con el sistema de tinción antes mencionado, sin anticuerpo específico (recuadro E), no presenta ninguna tinción para la ADAMTS-5, demostrando que las tinciones positivas que aparecieron en los demás tejidos corresponden específicamente a esta proteína.



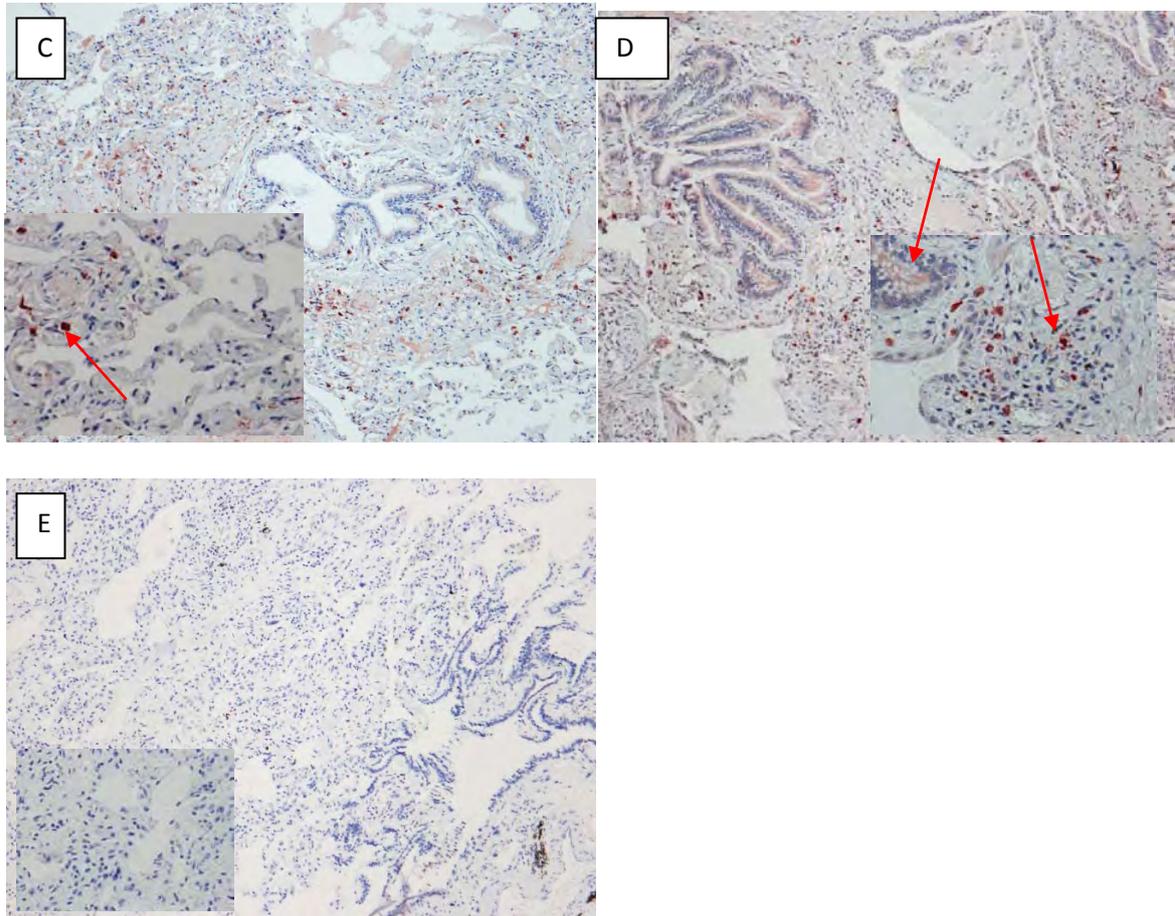


Figura 8 Detección inmunohistoquímica de la ADAMTS-5 en tejidos de pulmón normal y con fibrosis pulmonar idiopática. (A y B), PN (10x y 40 x); Cy D FPI (10 y 40x). (E) Control negativo sin anticuerpo. A y B Células inflamatorias (Flecha). C: Fuerte tinción de la ADAMTS-5 en células del espacio alveolar, células inflamatorias, como macrófagos. D: Tinción de la ADAMTS-5 en células plasmáticas madre (Flechas).

La ADAMTS-5 se encuentra sobre-expresada en pulmones con FPI

Se analizó la expresión de la ADAMTS-5 en tejidos de pulmón con FPI comparadas con PN mediante PCR en Tiempo Real. Como se observa en la figura 9, la expresión de la ADAMTS-5 en pulmón normal fue menor de 20 número de copias (# de Copias). En el caso de la FPI la expresión fue heterogénea mostrando algunos tejidos que expresan la proteína como en los pulmones normales y otros con una expresión mayor, yendo de 4.40 a 72.81 # de Copias. En promedio, se observó que la expresión de esta proteína es significativamente mayor en el grupo FPI comparado en PN (Figura 10).

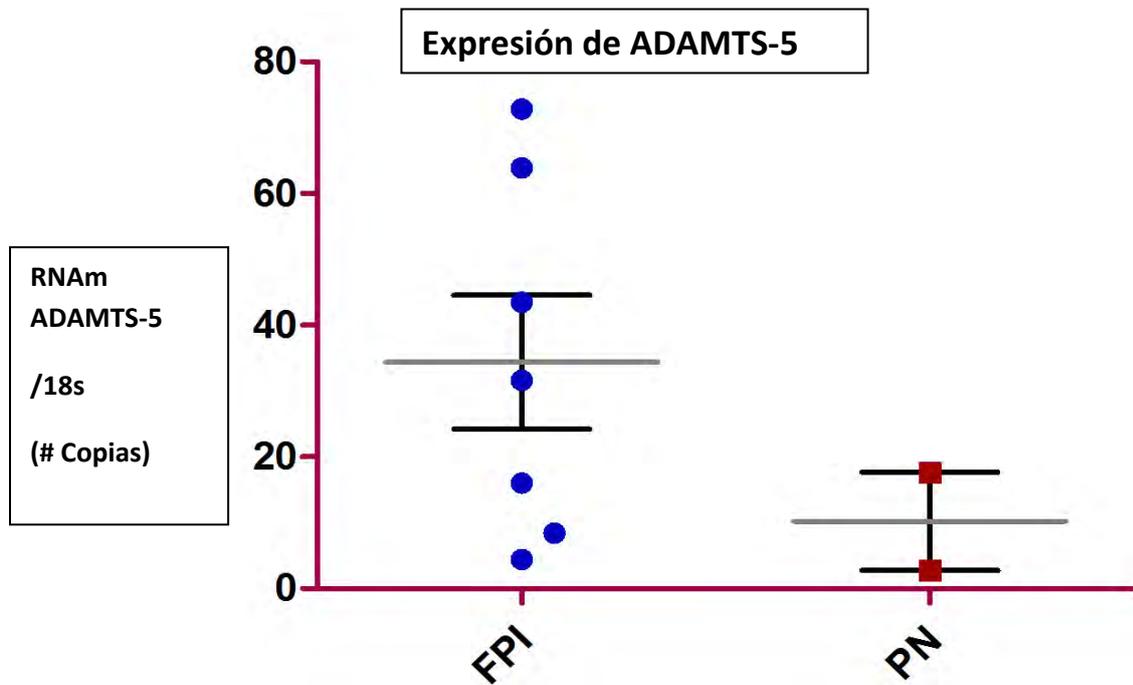


Fig. 9 Análisis de la expresión del mRNA de la ADAMTS-5 en tejidos de pulmón con FPI (cada punto en azul representa una muestra) y en PN (Cada punto rojo representa una muestra diferente), ajustada contra el RNA 18s mediante PCR Cuantitativa ($n \cdot 10^{-3}$). Se muestra la media con desviaciones estándar de cada grupo.

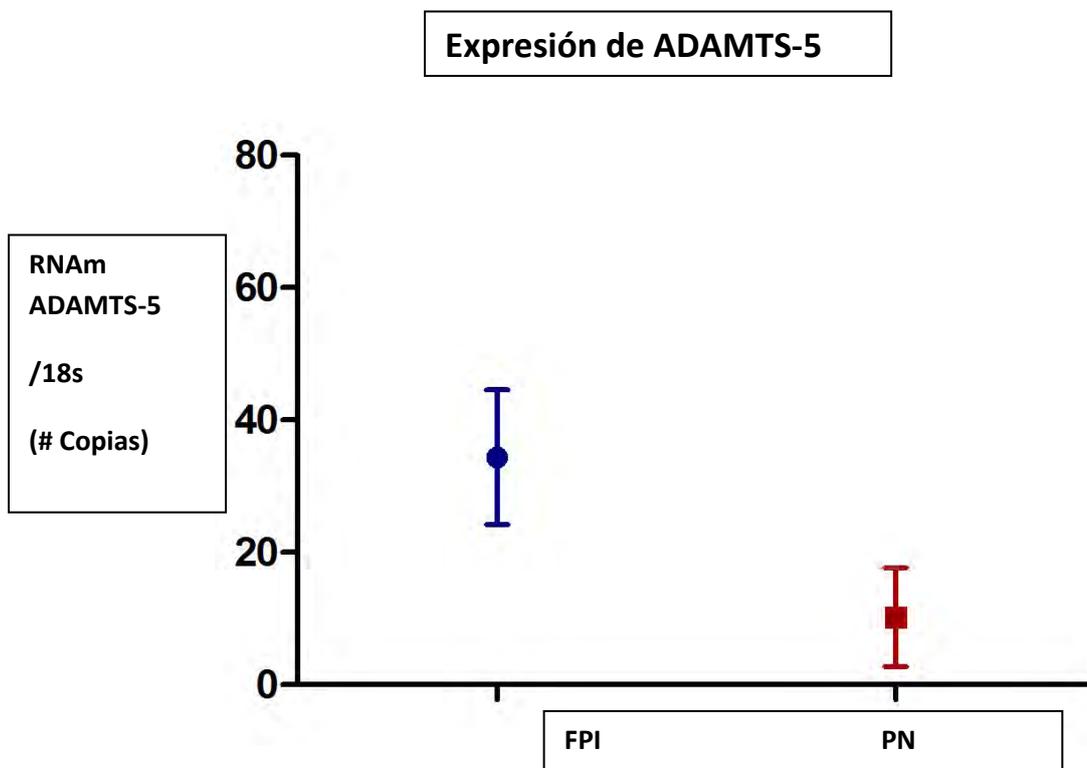


Fig.10 Comparación del porcentaje del número de veces de expresión de la ADAMTS-5 en tejidos con FPI contra PN. En cada grupo, se obtuvo un promedio con los valores de todos sus integrantes, en un experimento realizado por triplicado. La media se calculó con desviaciones estándar, obteniendo diferencias significativas entre los dos grupos con un $p \geq 0.05$.

Discusión

Las proteasas participan en el control de procesos fisiológicos y patológicos ya sea por la degradación completa de sustratos proteicos o por procesamiento proteolítico limitado que involucra la activación o inactivación entre otros de proenzimas, citocinas, quimocinas y factores de crecimiento. En este contexto, las proteasas controlan procesos biológicos vitales como la remodelación tisular, la regulación del ciclo celular, la migración y activación celular la reparación de heridas la angiogénesis y la apoptosis.

Se ha sugerido que la respuesta fibrosante en el pulmón, durante esta enfermedad, está mediada por un desequilibrio en la producción y degradación de la MEC (9). En este contexto, el papel que desempeñan las proteasas involucradas en este proceso es fundamental.

En un trabajo previo del grupo de trabajo se analizó por microarreglos la expresión génica de proteasas en pulmones con FPI. Este análisis, por los genes que se encontraron sobreexpresados mostró que la FPI no es solo una enfermedad de depósito de matriz extracelular, sino que se caracteriza por ser un proceso de intensa remodelación tisular. Entre los genes que se encontraban sobreexpresados, se encontró al gen *ADAMTS-5* (16).

El objetivo de esta tesis fue verificar por otros métodos si el gen *ADAMTS-5* se encontraba sobreexpresado. Se decidió utilizar la técnica de PCR en tiempo real, ya que a diferencia de la PCR convencional, la PCR en tiempo real es una técnica cuantitativa, que permite la realización de un análisis estadístico de los datos obtenidos (44); para medir los niveles del mensajero del gen *ADAMTS-5*, y se demostró que el mensajero de este gen se encuentra aumentado en FPI en comparación con los PN.

Asimismo se analizó la presencia de la proteína inmunoreactiva y se encontró fundamentalmente asociada a células plasmáticas y células inflamatorias intersticiales, como macrófagos y células cebadas. Se ha reportado que las células cebadas, pueden estar involucradas en procesos de fibrosis pulmonar, polarizan a las células T en Th2 (fenotipo profibrótico), a través de IL-4 e IL-3. En cultivo, las células cebadas inducen en los fibroblastos la pérdida de inhibición por contacto, proliferando y sintetizando una mayor cantidad de colágena tipo I. Sin embargo, no existen trabajos que reporten el papel que podrían desempeñar en la FPI. Por otra parte, los macrófagos, sintetizan varios mediadores profibróticos, como Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β). El TGF- β , es un factor de crecimiento que en la FPI se ha reportado promueve la formación de miofibroblastos a partir de fibroblastos (9).

La ADAMTS-5 es una proteasa que puede degradar decorina, biglicanos, brevicano, y se ha asociado con la progresión a AR. Sin embargo, no existen trabajos asociados con fibrosis pulmonar y sería importante avanzar en el conocimiento del papel que desempeña en esta patología.

Conclusión

La ADAMTS-5 es una proteína altamente estudiada en patologías del cartílago involucradas en la degradación de la MEC como son OA y AR (23,24), y se le asocia con la degradación del agregano, que constituye el 10% del cartílago y tiene la propiedad de interactuar con el ácido hialurónico, permitiendo la formación de agregados de peso molecular brindando al tejido su alta fuerza de compresión (2). Recientemente en nuestro laboratorio se encontró que el gen *ADAMTS-5* estaba elevado en FPI (16). En este sentido, se analizaron por PCR en tiempo real la expresión de la ADAMTS-5 en tejidos de pulmón

con FPI comparadas con PN, y se analizó por inmunohistoquímica la localización de la proteína. En conclusión, en este estudio se determinó que los niveles de expresión del mRNA de la ADAMTS-5 en tejidos de pulmones con FPI es mayor ($P \geq 0.05$) que en PN y que su localización inmunohistoquímica es en células inflamatorias, como macrófagos y células cebadas, así como en células plasmáticas y se encuentran en mayor proporción en tejidos de pulmón con FPI comparadas con PN. Conjuntamente, estas observaciones soportan mi hipótesis de que la ADAMTS-5 podría estar involucrada en la degradación/regulación de la MEC en FPI. Sin embargo, se sabe por estudios anteriores, que esta proteasa es incapaz de degradar algunos componentes de la MEC, ni colágenas ni fibronectina; ni otros sustratos como caseína ni gelatina (28); además, no existen trabajos que puedan relacionar a esta proteína con su posible sustrato en FPI, ni el papel que podría tener en esta patología, por lo que sería importante continuar con trabajos que aumenten el conocimiento de esta proteína.

Bibliografía

1. Pizzo A, Kokni K, Vaughn L, Waisner B y Voytik-Harbin. Extracellular matrix (ECM) microstructural composition regulates local cell-ECM biomechanics and fundamental fibroblast behavior: a multidimensional perspective. **J Appl Physiol.**2005, 98:1909-1921.
2. Frevert C and Sannes P. Matrix proteoglycans as effector molecules for epithelial cell function. **Eur Respir Rev.** 2005.14:137-144.
3. Mosyak L, Georgiadis K, Shane T, Svenson K, Herbert T, McDonagh T, mackie S, olland S, Lin L, Zhong X, Kriz R, Reifenberg E, Collins-Racie L, CorcoranC, Freeman B, Zollner R, Marvell T, Vera M, Sum P, Lavallie E, Stahl M y Somers W. Crystal structures of the two major aggrecan degrading enzymes: ADAMTS-4 and ADAMTS-5. **Prot Science.**2002.17:16-21.
4. Tortorella M, Pratta M, Liu R-Q, Abbaszade I, Ross H, Burn T and Arner E. The Thrombospondin motif of Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. **J of Biol Chem.**2000.275:25791-25797
5. Wight T. The ADAMTS proteases, Extracellular matrix and vascular disease: walking the sleeping giant(s)!. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**2005.25:12-14.
6. McGowan S. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. **The FASEB J.**1992.6:2895-2904.
7. Rangel Y, Ospelt C and Gay S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. **Arthritis Res Ther.**2007.9:221-230.

8. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson S, Wilson K, Aziz N, Kaminski N y Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. **Am J Respir Crit Care Med.**2006.173:188-198.
9. Selman M, Pardo A. The Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. In Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, 4th edition, McGraw-Hill, New York, 2008. 371-383.
10. Selman S, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolution hypothesis about its pathogenesis and implications for therapy. **Ann Intern Med** 2001.134:136-51.
11. Pardo A and Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol.**2002.34:1534-1538.
12. Pardo A and Selman M. Matrix Metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. **Proc Am thorac Soc.**2006.3:383-388.
13. Selman M, Thannickal V, Pardo A, Zisman D, Martínez F y Lynch J III. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. **Drugs.**2004.64:405-430.
14. Garrod R, Marshall J, Barley E, Jones PW. Predictors of success and failure in pulmonary rehabilitation. **Eur Respir J.**2006.4:788-794.
15. Ilman S. Molecular biology and functions of epilysin (MMP-28). **Helsinki.**2007.98:1-74.

16. Pardo A, Selman M and Kaminski N. Approching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. **Int J Biochem Cell Biol.**2008.40:1141-1155.
17. Porter S, Clark L, Kervorkian L y Edwards D. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochem J.**2005.386:15-27.
18. Zhu H, Leung P and MacCalman C. Expression of ADAMTS-5/Implantin in human decidual stromal cells: regulatory effects of cytokines. **Hum Repr.**2007.22:63-74.
19. Mercuri I, Maciewicz R, Tart J, Last y Fosang A. Mutations in the interglobular domain of aggrecan after matrix metalloproteinase and aggrecanase cleavage patterns. **J of Biol Chem.**2000.275:33038-33045.
20. Iruela M, Luque A and Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis. **Int J Biochem Cell Biol.**2004.36:1070-1078.
21. Jones G and Riley G. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. **Arthritis Res Ther.**2005.7:160-169.
22. Apte S. A disintegrin-like and metalloprotease (Reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: Functions and mechanisms. **J Biol Chem.**2009.284:31493-31497.

23. Yamanishi Y, Boyle D, Clark M, Maki R, Tortorella M, Arner E y Fierestein G. Expression and regulation of aggrecanase in Arthritis: The role of TGF- β . **J Immun.**2002.168:1405-1412.
24. Vankemmelbeke M, Holen L, Wilson A, Ilic M, Handley C, Kelner G, Clark M, Liu C, Maki R, Burnett D y Buttle D. Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. **Eur J Biochem.**2001.268:1259-1268.
25. Song R, Tortorella M, Malfait A, Alston J, Yang Z, Elizabeth C y Griggs D. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. **Arthritis Rheum.**2007.56:575-585.
26. Tang B. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. **Int J Biochem Cell Biol.**2001.33:33-44.
27. Gendron C, Kashiwagi M, Han N, Enghild J, Thøgersen I, Hughes C, Caterson B y Nagase H. Proteolytic activities of human ADAMTS-5 comparative studies with ADAMTS-4. **J of Biol Chem.**2007.282:18294-18306.
28. Nagase H and Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. **Arthritis Res Ther.**2003.5:94-103.
29. Stanon H, Rogerson F, East C, Golub S, Lawlor K, Meeker C, Little C, Last K, Farner P, Campbell I, Fourie A y Fosang A. ADAMTS-5 is the major aggrecanase in mouse cartilage *in vivo* and *in vitro*. **Nature.**2005.434:648-652.

30. Fosang A, Rogerson F, East C y Stanon H. ADAMTS-5 the story so far. **Eur Cells and Mat.**2008.15:11-26.
31. Zeng W, Corcoran C, Collins-Racie L, La vallie E, Morris E y Flannery C. Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTS: Comparative analyses with ADAMTS-5,-9,-16 and -18. **Biochem Biophys Acta.**2006.1760:517-524.
32. Nakada M, Miyamori H, Kita D, Takahashi T, Yamashita J, Sato H, Miura R, Yamaguchi Y y Okada Y. Human giloblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican. **Acta Neuropathol.**2005.110:239-246.
33. Abbaszade I, Liu R-Q, Yang F, Rosenfeld S, Ross O, Link J, Ellis D, Tortorella D, Prata M, Hollis J, Wynn R, Duke J, George H, Hillman M, Jr., Murphy K, Wiswall B, Copeland R, Decicco C, Bruckner R, Nagase H, Itoh Y, Newton R, Magolda R, Trzaskos J, Hollis G, Arner E y Burn T. Cloning and characterization of ADAMTS-11, an aggrecanase from the ADAMTS family. **J of Biol Chem.**1999.274:23443-23450.
34. Glasson S, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma H-L, Flannery C, Peluso D, Kanki K, Ynag Z, Majumdar M y Morris E. Deletion of active ADAMTS-5 prevents cartilage degradation in a murie model of osteoarthritis. **Nature.**2005.434:644-648.
35. Malfait A-M, Arner E, Song R-H, Alston J, Markosyan S, Staten N, yang Z, Griggs D and Tortorella M. Protein convertase activation of aggrecanases in cartilage *in situ*.**Archives of Biochem and Biophys.**2008.478:43-51.

36. Tortorella M, Arner E, Hills R, Easton A, Korte-Sarfaty J, Fok K, Wittwer A, Liu H-Q y Malfait A-M. α_2 – Macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor for these enzymes. **J of Biol Chem.**2004.279:17554-17561.
37. Davidson R, Waters J, Kevorkian L, Darrah C, Cooper A, Donell S y Clark I. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. **Arthritis Res Ther.**2006.8:1-10.
38. Chockalingam, P. S., Zeng, W., Morris, E. A. and Flannery, C. R. Release of hyaluronan and hyaladherins (aggrecan G1 domain and link proteins) from articular cartilage exposed to ADAMTS-4 (aggrecanase 1) or ADAMTS-5 (aggrecanase 2). **Arthritis & Rheum.**2004.50: 2839–2848.
39. Makihiro S, Yan W, Murakami H, Furukawa M, Kawai T, Nikawa H, Yashida E, Hamada T, Okada Y y Kato Y. Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAMTS-5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage. **Endocrinology.**2003.144:2480-2488.
40. Shieh H-S, Mathis K, Williams J, Hills R, Wiese J, Benson t, Kiefer J, Marino M, Carroll j, Leone J, Malfait A-M, Arner E, Tortorella M y Tomasselli A. High resolution crystal structure of the catalytic domain of ADAMTS-5 (Aggrecanasa 2). **J of Biol Chem.**2007.283:1501-1507.
41. Mujumdar M, Askew R, Schelling S, Stedman N, Blanchet T, Hopkins B, Morris Ey Glasson S. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in

physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. **Arthritis & Rheum.**2007.56:36-70-3674.

42. Przedboski S, Pahan K, Kipnis J and Kabanov A. Neuroimmune pharmacology. Springer, Nueva York,2008.pp.827

43. Dobson J and Scase T. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. **J Small Anim Pract.**2007.48:424-431.

44. Yuan J, Reed A, Chen F and Stewart N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinform.**2006.7.