

14
00346

2ej
11/3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

EXPRESION Y PRODUCCION DE COLAGENASAS
TIPO IV POR FIBROBLASTOS DE PULMON
NORMAL Y CON FIBROSIS IDIOPATICA

T E S I S

Que para obtener el grado académico de
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

p r e s e n t a

MARIA DE LOS REMEDIOS JOSEFINA RAMIREZ RANGEL

Directora de Tesis: Dra. Annie Pardo Semo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

249078



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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, bajo la dirección de la Dra. ANNIE PARDO SEMO a quien agradezco profundamente sus enseñanzas, sus consejos y su apoyo durante la realización del mismo.

A los miembros del jurado

A mis amigos

A MIS PADRES

Anselmo Ramírez Coronel.

Guadalupe Rangel Vda. de Ramírez

A MI HIJA

Susana Ramírez Rangel

A MIS HERMANOS

INDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	i
<u>RESUMEN</u>	1
<u>INTRODUCCION</u>	2
<i>La matriz extracelular y las metaloproteinasas</i>	2
<i>La familia de las metaloproteinasas</i>	3
<i>Fibrosis pulmonar</i>	4
<i>Mecanismos patogénicos de la fibrosis pulmonar</i>	10
<i>Hipótesis y objetivos</i>	12
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	13
<i>Lineas celulares</i>	13
<i>Condiciones de cultivo</i>	13
<i>Zimografía en geles de gelatina</i>	14
<i>Aislamiento de RNA y análisis tipo Northern</i>	15
<i>Amplificación y purificación de sondas</i>	16
<i>Obtención de los insertos</i>	18
<u>RESULTADOS</u>	21
<i>Zimograma con gelatina como sustrato</i>	21
<i>Análisis de RNA mensajero para Gelanasas A y B por Northern blot</i>	26
<u>DISCUSION</u>	31
<u>REFERENCIAS</u>	34

ABREVIATURAS

ATTC	American Type Culture Collection
DNA	Acido desoxiribonucleico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
GADPH	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
IL-1 β	Interleucina 1 β
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
LTC4	Leucotrieno C4
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas
MT-MMP	Metaloproteinasas de membrana
PMA	Forbol miristato acetato
RNA	Acido ribonucleico
SFB	Suero fetal bovino
TIMP	Inhibidor de metaloproteinasas
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α

RESUMEN

La matriz extracelular (MEC) es un complejo insoluble de proteínas y carbohidratos que se encuentran fuera de la célula, entre el tejido epitelial y el endotelial de los animales multicelulares. Las metaloproteinasas responsables de la remodelación del tejido conjuntivo comprenden una familia génica de enzimas que degradan diferentes componentes de la matriz. Entre algunas de estas enzimas se han caracterizado dos diferentes gelatinasas A y B capaces de degradar la colágena tipo IV de membranas basales. En condiciones fisiológicas existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz lo cual ocurre de manera finamente programada y balanceada. Por el contrario una remodelación desequilibrada de la MEC se ha asociado con diferentes procesos patológicos.

Durante la fibrosis pulmonar, que es el resultado de un amplio y heterogéneo grupo de padecimientos respiratorios, se caracteriza por el depósito exagerado de colágenas intersticiales que destruyen progresivamente las unidades alveolo-capilares y conducen a la aparición de insuficiencia respiratoria crónica incapacitante y habitualmente letal en un plazo relativamente breve de tiempo. En este proceso patológico se ha encontrado por estudios inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica que las membranas basales presentan extensas áreas de ruptura la que se ha asociado al inicio de la inflamación y fibrósis.

El objetivo de este estudio fue analizar y comparar la expresión y síntesis de las gelatinasas A y B en fibroblastos obtenidos de pulmón normal y con fibrosis. Se trabajó con 6 líneas de fibroblastos fibróticos y 4 líneas de fibroblastos normales y se hizo el análisis mediante las técnicas de zimografía inversa, y el northern blot.

Los resultados encontrados mostraron que la actividad enzimática de la gelatinasa de A se presenta constitutivamente tanto en fibroblastos normales como en los derivados de fibrosis pulmonar. Por el contrario la gelatinasa B no mostró actividad enzimática, ni aún bajo el estímulo de diferentes citocinas (Interleucina β , Leucotrieno C4, Sustancia P o con promotores de tumores PMA). Por otra parte, sólo pudo mostrarse la expresión del mensaje del RNA de la gelatinasa A en los fibroblastos estudiados, pero no se logró obtener mensaje de la gelatinasa B, para el cual se usó como control positivo línea U2OS, estimulada con forbol miristato (PMA). Estos resultados sugieren que la gelatinasa A es la principal colagenasa tipo IV sintetizada en el parénquima pulmonar.

INTRODUCCION

La matriz extracelular y las metaloproteinasas (MMPs)

La matriz extracelular (MEC) es un complejo insoluble de proteínas y carbohidratos que se encuentra fuera de las células entre el tejido epitelial y el endotelial de los animales multicelulares. Su abundancia en los diferentes órganos es muy variable, así en la piel, cartilago tendón y hueso es un componente muy abundante, mientras que en el cerebro y la médula espinal es muy escaso. La MEC está conformada por una gran variedad de moléculas que interaccionan entre sí generando una estructura tridimensional a la cual las células se adhieren ya sea por receptores específicos. Las macromoléculas que constituyen la MEC incluyen, entre otras, a la familia de las colágenas que son las responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, la elastina que le confiere cualidades de y elasticidad, proteínas de adhesión como fibronectinas y lamininas, y los proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad. Presenta un papel importante no sólo en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos si no además, desempeña un papel activo y complejo en la regulación de los procesos básicos de las células que tienen contacto con ella. En este sentido la MEC influye en múltiples funciones celulares tales como morfogénesis, proliferación, diferenciación, migración y adhesión (1, 2).

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz, lo cual ocurre de una manera finamente programada y balanceada. Por el contrario, una remodelación desequilibrada de la MEC se ha asociado con diferentes procesos patológicos. (3)

La familia de las metaloproteinasas de matriz

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son las principales enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular y desempeñan un papel central en diversos procesos fisiológicos como la morfogénesis, angiogénesis, e inflamación (3-5).

Esta familia de endopeptidasas comparte un conjunto de dominios (Figura 1) entre los que se encuentran:

- Un dominio propeptídico responsable de la latencia (falta de actividad catalítica) de las proenzimas. En este dominio existe un residuo de cisteína que forma un enlace coordinado con el Zn^{2+} presente en el dominio catalítico, y que enmascara de esta manera el sitio activo de las proenzimas o zimógenos.
- Un dominio catalítico esencial para la actividad enzimática y que contiene el sitio de unión a Zn^{2+} y a Ca^{2+} .
- Una secuencia rica en prolina que funciona como bisagra
- Un dominio carboxilo terminal tipo hemopexina

Las MMPs se pueden clasificar en diferentes subfamilias que incluyen a las colagenasas, gelatinasas, estromelinas y las metaloproteinasas “tipo membrana”.

Existen enzimas, con características específicas, que no han podido agruparse en las subfamilias anteriores y provisionalmente se han agrupado bajo el rubro de “otras”.

(Tabla 1).

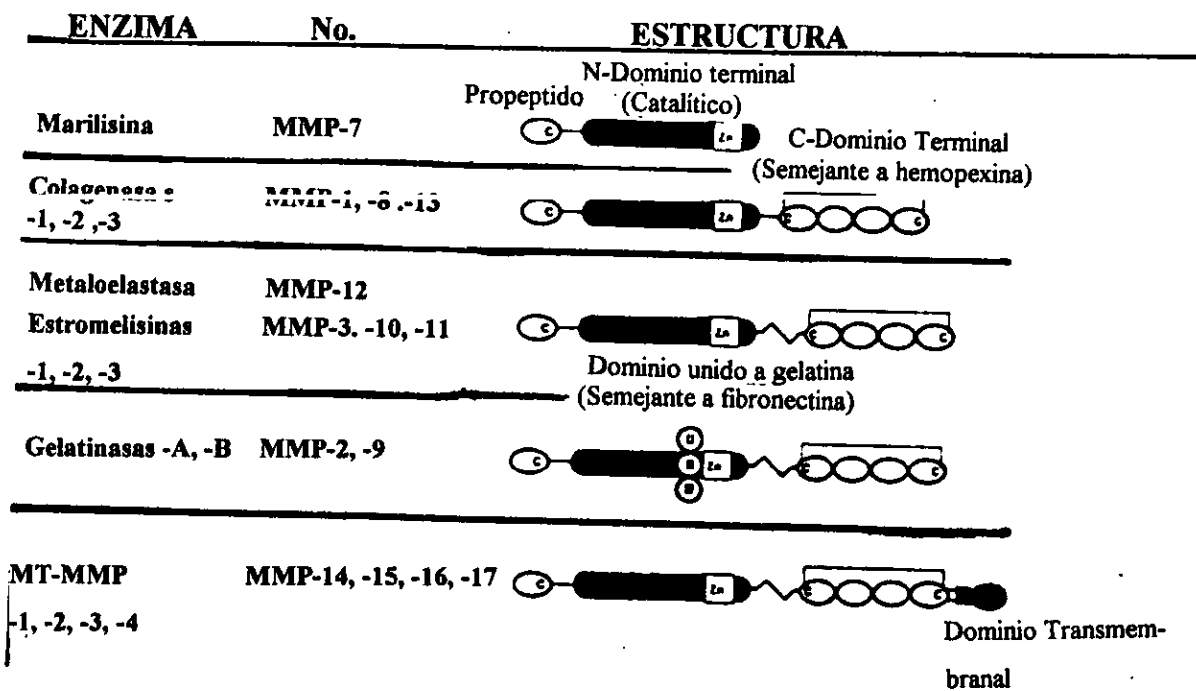


FIG 1. Esquema de la estructura de las metaloproteinasas

TABLA 1. FAMILIA DE METALOPROTEINASAS DE MATRIZ (MMPS)

ENZIMA	Nº DE MMP	SUSTRATO
<p><u>COLAGENASAS</u> Colagenasa intersticial Colagenasas de PMN Colagenasa-3</p>	<p>MMP-1 MMP-8 MMP-13</p>	<p>Colágena Intersticial: I, II, III, VII, VIII, X colágena fibrilar, gelatinas, fibronectina, proteoglicanos.</p>
<p><u>GELATINASAS</u> Gelatinasa 72 kDa-(A) Gelatinasa 92 kDa-(B)</p>	<p>MMP-2 MMP-9</p>	<p>Colágena desnaturalizada (gelatina), elastina, colágenas nativas IV, V, VII, X ; fibronectina.</p>
<p><u>ESTROMELISINAS</u> Estromelisin-1 Estomelisin -2 Estromelisin-3</p>	<p>MMP-3 MMP-1</p>	<p>Proteoglicanos, fibronectina, elastina, colágenas IV, V, IX, X, lamininas.</p>
<p><u>OTRAS</u> Matrilisinas</p>	<p>MMP-7</p>	<p>Proteoglicanos, colágena tipo IV, gelatinas elastinas, fibronectina.</p>
<p>Metaloelastasa</p>	<p>MMP-12</p>	<p>Proteoglicanos, elastina, colágena IV, gelatinas, fibronectina, elastina.</p>
<p>Enamelisina</p>	<p>MMP-19 MMP-20</p>	<p>Degrada sustratos sintéticos para las MMPs Proteína dental</p>
<p><u>MT MMPs</u> ♦ MT-1 MMP ♦ MT-2 MMP ♦ MT-3 MMP ♦ MT-4 MMP</p>	<p>MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17</p>	<p>Colágena fibrilar, Gelatina Pro-gelatinas A, caseína</p>

Por lo que se refiere a las colagenasas, esta subfamilia de metaloproteinasas rompe enlaces peptídicos en la región triple helicoidal de las colágenas intersticiales y a la fecha, tres miembros de este grupo han sido clonados: MMP-1, llamada también colagenasa intersticial de fibroblastos, MMP-8 denominada colagenasa de neutrófilos, y MMP-13 o colagenasa 3, clonada de un carcinoma humano mamario (6-8).

La subfamilia de las gelatinasas comprende enzimas que degradan colágena tipo IV, principal constituyente de membranas basales, colágenas V, IX, X, fibronectina y elastina, y a la fecha se han caracterizado dos miembros en este subgrupo que son la Gelatinasa A (colagenasa tipo IV de 72 kDa/MMP2), y la Gelatinasa B (colagenasa tipo IV de 92 kDa/MMP-9) (9, 10). Ambas enzimas contienen un dominio adicional parecido a fibronectina, y la gelatinasa B contiene también una región en el carboxilo terminal que es semejante a la cadena alfa 2 de la colágena tipo V.

La subfamilia de estromelisinias tiene una amplia especificidad de sustratos que incluye a la parte proteica de los proteoglicanos, a la fibronectina, y la laminina. Varias enzimas se han clasificado tentativamente en este grupo e incluyen a la estromelisina 1 (MMP-3), estromelisina 2 (MMP-10) y estromelisina 3 (MMP-11) (11, 12).

La subfamilia de metaloproteinasas de membrana (MT-MMP), recientemente descubierta, se caracteriza principalmente por la presencia de un dominio transmembranal extensión terminal rico en residuos hidrofóbicos. A la fecha se han

caracterizado cuatro enzimas, y se ha propuesto que este tipo de enzimas son responsables del procesamiento de varias enzimas en la superficie celular (13-16).

Otras metaloproteinasas son: la matrilisina (MMP-7), que es la enzima mas pequeña de las metaloproteinasas y carece del dominio carboxilo terminal que se encuentra presente en todas las otras (17); la metaloelastasa (MMP-12) de macrófagos (18); la metaloproteinasa MMP-18 (19, 20); y la enamilisina o MMP-20 (21).

La regulación de las MMPs ocurre a varios niveles tanto intra como extracelulares y la actividad enzimática es el resultado final de una compleja serie de eventos que incluye la expresión del gen, la activación del zimógeno y la inhibición enzimática en el espacio extracelular.

La expresión génica es regulada por una variedad de citocinas, tales como factores de crecimiento y mediadores inflamatorios los cuales pueden incrementar o disminuir la síntesis de la enzima en una célula específica (22). La expresión de los genes de colagenasa, estromeolisina-1, matrilisina y gelatinasa B es regulada en una gran variedad de tipos celulares por el forbol miristato acetato (PMA). También citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) , el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la interleucina-1 (IL-1), son capaces de aumentar la expresión de estas enzimas generalmente a través de una combinación de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. (3- 5).

Otro nivel de regulación es la activación del zimógeno que in vitro puede realizarse con compuestos mercuriales o a través de la digestión parcial con varias proteasas.

Es de especial interés que la progelatinasa A difiere en estos mecanismos de

activación extracelular ya que no es susceptible de ser procesada por proteasas que activan a otras metaloproteasas, pero puede ser activada por la MT1-MMP (23).

Finalmente por lo que se refiere al nivel de regulación por inhibición, los principales inhibidores fisiológicos de las MMPs son una familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), de los cuales se han identificado 4 tipos diferentes denominados TIMP-1, 2, 3 y 4. Los TIMPs forman complejos de alta afinidad con las formas activas de MMPs e inhiben su actividad enzimática a través de una interacción no covalente (24).

La participación de las MMPs en condiciones fisiológicas está bien documentada en procesos como la ovulación, la involución uterina, angiogénesis, remodelación ósea, etc. Las MMPs participan además en la respuesta inflamatoria y desempeñan un papel importante en el desarrollo de numerosos procesos patológicos que incluyen a la artritis reumatoide, invasión tumoral, enfermedades fibrosantes, enfisema, y daño pulmonar agudo entre otros (5, 25, 26). En este contexto, un incremento descontrolado en la actividad de estas enzimas puede provocar daños tisulares como el que se observa por ejemplo, en la artritis reumatoide en la cual el cartilago, es degradado progresivamente por colagenasa intersticial. Una situación similar ocurre en el enfisema pulmonar, donde se ha observado una actividad elastolítica y colagenolítica exageradas lo que puede contribuir a la destrucción de las paredes alveolares del pulmón (25, 27).

Fibrosis Pulmonar

La fibrosis pulmonar es el resultado de un grupo heterogéneo de padecimientos conocidas como enfermedades intersticiales del pulmón que tienen en común la presencia inicial de inflamación difusa en el parénquima pulmonar seguido de proliferación anormal de fibroblastos y la acumulación progresiva de matriz extracelular, principalmente colágenas intersticiales. (28, 29). A pesar de múltiples estudios realizados tanto en la enfermedad humana como en modelos experimentales que reproducen algunos rasgos del padecimiento, los mecanismos responsables y la secuencia de los eventos que llevan a la fibrosis pulmonar se desconocen. La fibrosis pulmonar idiopática se caracteriza inicialmente por la presencia de lesión epitelial y endotelial, y una inflamación intersticial e intra-alveolar que afecta difusamente al parénquima pulmonar. Esta alveolitis es de predominio mononuclear, aunque suelen observarse acúmulos de neutrófilos y eosinófilos. Esta fase inicial se considera potencialmente reversible. Posteriormente, y probablemente motivado por la sobre-expresión de factores de crecimiento, se produce la proliferación exagerada de fibroblastos y miofibroblastos, con apoptosis del epitelio alveolar y finalmente depósito excesivo de matriz intersticial, especialmente colágenas tipos I y III (28-31). Esta fase avanzada se considera irreversible.

Mecanismos patogénicos de la fibrosis pulmonar

En este contexto, diferentes estudios han demostrado, tanto en modelos animales como en pacientes con fibrosis pulmonar, un aumento transitorio de la síntesis de colágena y una cicatrización con precisión (32, 33).

La importancia de las membranas basales en la conducción de una regeneración ordenada después del daño pulmonar ha sido reconocida desde hace tiempo. Por ejemplo, Vracko (34) estudió por microscopía electrónica los cambios patológicos secuenciales producidos en pulmones de perros después de una inyección intravenosa de ácido oleico. En este modelo observó que si la lesión inicial no se acompañaba de alteraciones en las membranas basales epiteliales y endoteliales el parénquima pulmonar se regeneraba ad integrum. En cambio, la pérdida de integridad de las membranas basales favorecía la aparición de lesiones fibrosantes.

Más recientemente, Raghu y cols. (35) a través de inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos contra colágena tipo IV y laminina, encontraron que existe ruptura de las membranas basales en la mayoría de los pacientes con fibrosis pulmonar. La destrucción de las membranas se observó mucho más frecuentemente en las etapas iniciales de la enfermedad, lo que sugiere que el daño a esta estructura es un evento temprano en el desarrollo de la fibrosis. Sin embargo, no existe a la fecha ningún estudio que analice los posibles mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno patológico.

La pérdida de integridad de las membranas basales alveolo-endoteliales evitaría la adecuada reepitelización post-necrosis, facilitaría la salida de fibroblastos a los

espacios alveolares y representaría un estímulo para la fibrogénesis tanto intersticial como intra-alveolar.

Las membranas basales están constituidas por varias macromoléculas además de metaloproteinasas, siendo la más abundante la colágena tipo IV, la cual es susceptible de ser degradada por dos miembros de las metaloproteinasas, las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9) (36-37).

En este contexto, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio en modelos de lesión pulmonar aguda y subaguda inducidas con hiperoxia han demostrado que la expresión exagerada de las gelatinasas con incremento en la actividad gelatinolítica local precede y/o acompaña a la ruptura de las membranas basales (26, 38).

Un asunto de especial interés es conocer cuáles son las células responsables de la producción de las gelatinasas en pulmón. Por estudios *in vivo* e *in vitro* nuestro grupo ha mostrado que los neumocitos tipo II, los macrófagos alveolares y los fibroblastos expresan la gelatinasa A. Esta colagenasa tipo IV de 72 kDa, es probablemente la metaloproteinasa más ampliamente distribuida en diferentes tejidos y la expresan constitutivamente por la mayoría de las células en cultivo respondiendo solo moderadamente a factores de crecimiento o citocinas (26, 39, 41).

Por otra parte la gelatinasa B es producida en pulmón por neumocitos tipo II, por monocitos/macrófagos, y por neutrófilos (38, 40- 42). Esta colagenasa tipo IV de 92 kDa se ha reportado ocasionalmente en fibroblastos de otros tejidos (43). La transcripción de la gelatinasa B es regulada por diversas citocinas entre las que se

encuentran la interleucina-1, el factor de necrosis tumoral, el factor de crecimiento epidérmico y por ésteres de forbol como, el forbol miristato acetato (PMA) (3-5, 44).

Hipótesis y objetivo

La hipótesis de trabajo de esta tesis es que en la fibrosis pulmonar los fibroblastos son capaces de sintetizar gelatinasa B, la cual no se produce por estas células en condiciones normales.

Por lo tanto el objetivo de la tesis fue: Analizar y comparar la expresión y síntesis de Gelatinasa A y Gelatinasa B en fibroblastos obtenidos de pulmón normal y con fibrosis.

MATERIAL Y METODOS

Lineas celulares

Se usaron varias lineas de fibroblastos humanos provenientes de pacientes con fibrosis pulmonar, algunas comerciales obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) y otras obtenidas de biopsias de pacientes con fibrosis pulmonar en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (39).

Además se usaron en este estudio lineas de fibroblastos humanos control obtenidos de pulmón normal tanto de la ATCC como de fragmentos macro y microscópicamente normales de biopsias de pulmón con cáncer.

Fibroblastos de pulmones fibróticos

Fibroblastos de pulmones "normales"

Nombre	Fuente	Nombre	Fuente
LL-29	ATCC	CCDILU	ATCC
LL-97	ATCC	CCD25	ATCC
HIPF-30	INER	LL-24	ATCC
HIPF-34	INER	N2	INER
HIPF-33	INER		
HIPF-40	INER		

Además se usó como control positivo de producción de gelatinasa B la linea de U2OS (células de sarcoma osteogénico) proveniente de la ATCC.

Condiciones de cultivo

Los fibroblastos se sembraron en cajas T25 en medio FK-12 (Sigma) con 10 % de suero fetal bovino (SFB) desactivado previamente a 56°C durante 30 minutos. A este medio se le agregaron 10 ml/l de una solución de antibióticos que contienen 100 U/ml de penicilina, 10 µl/ml de estreptomycin y 250 µg/ml de anfotericina

(Sigma). La línea celular U2-OS se cultivó en medio Mc Coy (Sigma) y 20% de SFB. Las células se incubaron a 37°C en 5% CO₂, 95% aire y el medio se cambió cada tercer día hasta alcanzar las células subconfluencia. De ahí las células se lavaron con medio 2 veces y se mantuvieron en medio libre de suero durante 24 h o el medio con las siguientes sustancias: PMA 10 nM, Leucotieno C4 10 nM, TGF β 0.4nM, Sustancia P 25 ng/ml, o IL-1β 250 U. Al finalizar las 24 h de exposición se colectó el medio de cultivo se colectoes colectado y se mantuvo en congelación hasta su uso para electroforesis o zimografía. Por otro lado las células fueron usadas para la extracción del RNA.

Zimografía en geles de gelatina

Este ensayo se utilizó para evaluar la actividad de la MMP-2 y MMP-9. Para este efecto, se usaron geles de poliacrilamida al 8 % con gelatina incorporada (1 mg/ml) que permite identificar enzimas con actividad gelatinolítica. Después de la electroforesis, los geles se colocaron en una solución de Tritón X-100 (dos veces por 15 minutos), se lavaron abundantemente con agua y se incubaron toda la noche a 37°C en glicina 100 mM pH 8.0, con CaCl₂ 10 mM y ZnCl₂ 50 mM. Geles idénticos se incubaron en presencia de EDTA 20mM. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie R-250 al 1% en isopropanol al 25%y ácido acético y se destiñeron en una solución de ácido acético al 7.5% y metanol al 5%. Las zonas de actividad enzimática se observaron como bandas claras contra un fondo azul. El peso molecular de las bandas gelatinolíticas se estimó usando marcadores de peso molecular pre-teñidos.

Aislamiento de RNA y análisis tipo Northern.

El RNA total se obtuvo por el método de extracción de Chomczynski y Sacchi con tiocianato de guanidina, fenol cloroformo (45). A continuación se explicarán brevemente los pasos principales. Se agregó a las cajas de cultivo 1-2 ml de solución desnaturante que contiene isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7, laurilsarcosin 0.5% y 2-mercaptoetanol 0.1M. A esta suspensión se adicionó 1/10 del volumen de acetato de sodio 2M pH 4, un volumen de fenol, y un volumen de cloroformo. Se centrifugó a 15 700 g por 20 min a 4°C y se separaron tres fases; el RNA queda en la fase acuosa, que después de separada el volumen recuperado se mezcla con un volumen de isopropanol frío y se deja a -20°C toda la noche, una vez precipitado. se centrifuga a 15 700 g durante 10 a 4° C y se recupera el RNA en un volumen final no mayor a 30 µl de TE .

Una vez obtenido el RNA, se cuantificó espectrofotométricamente mediante la lectura de D.O a dos diferentes longitudes de onda, una a 260 nm y la otra a 280 nm. Esta relación nos permite además de conocer la concentración, valorar la pureza del RNA extraído. Se considera que 1 U de D.O a 260 nm equivale a 50 µg de RNA y un buen grado de pureza una relación 260 / 280 de 1.7 a 2.0.

El RNA total se fraccionó (10 µg/carril) en un gel de agarosa al 1% con 0.66 M de formaldehído y posteriormente se transfirió a membranas de nylon (Nytran) mediante capilaridad. El RNA se fijó horneando a 80°C por 1 h (46).

Las membranas se prehibridaron a 42°C por 16 h en 5 x SSC, formamida al 50%, solución de Denhardt 5 x y SDS al 5%, con 100 µg/ml de DNA desnaturizado de

esperma de salmón. La hibridación se realizó a 42°C por 16 h en el amortiguador de hibridación que contiene más 4 ml de sulfato de dextrán 50% más la sonda marcada con ³²P desnaturalizada a hervor en baño maría a 85 °C / 5 min . Las membranas se lavaron con SSC 2X y SDS al 1% a temperatura ambiente tres veces por 5 minutos, posteriormente 2 veces por 15 minutos y posteriormente con SSC 0.1x y SDS al 0.1%. Finalmente, las membranas se expusieron a una película Kodak X-AR a -70°C con una pantalla intensificadora. Para comparar la cantidad de RNA de las muestras, se midió el nivel de mRNA de un gen constitutivo, el gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Las sondas de gelatinasas A y B, y del GAPDH se marcaron [³²P]dCTP utilizando la técnica del marcado por extensión al azar descrito por Feinberg y Vogelstein (47) siguiendo las especificaciones del proveedor del kit Du Pont, NEN Research Products (Dupont NEP-103).

Amplificación y purificación de las sondas

En este estudio se transformaron bacterias (*Escherichia coli*) según el método reportado por Hanahan y col que utiliza CaCl₂ (48). Las sondas utilizadas fueron cDNA de las gelatinasas de 92 kD y de 72 kD donadas por G. Goldberg de la División de Dermatología de la Washington University (Saint Louis MO) que consiste brevemente en el siguiente procedimiento: Las bacterias se crecen en medio LB (Luria) que contiene extracto de levadura al 0.5% , triptona al 1% y cloruro de sodio al 1%. Un cultivo con una D.O de 0.4 -0.6 se centrifuga a 200 g y la pastilla se resuspende en 10 ml de CaCl₂ 50 mM frío, se da una segunda lavada

de la pastilla bacterial con el mismo cloruro de calcio y las células son resuspendidas en un volumen final de 1.3 ml de este CaCl_2 , posteriormente a la suspensión de células ya competentes se le adiciona 0.1 ml de DNA recombinante. Para introducir este DNA a la bacteria, se dá un choque térmico a 42°C durante 2 min seguido de una incubación de 10 min a temperatura ambiente. La suspensión celular se siembra en cajas Petri que contienen medio LB más el antibiótico adecuado para seleccionar las colonias transformadas (ampicilina ó tetraciclina) y se crecen a 37°C durante toda la noche. De las colonias formadas se toma al azar una de las cías y se siembra en medio LB con el antibiotico a para, por un lado ,preservar la cepa transformada y por el otro, para amplificar las bacterias transformadas con cada una de las sondas utilizadas. Como se mencionó anteriormente, en este estudio se usaron las sondas de la gelatinasa A de 72 kD-G72, de la gelatinasa B de 92 kD-G92 y del gliceraldehido fosfato deshidrogenasa-GADPH.

La amplificación del plásmido se realizó siguiendo una modificación del método de lisis alcalina reportado por Birhoim y Doly (49).Una colonia de bacterias aislada se crecio en 250 ml del medio LB durante toda la noche con agitación constante de 250 rpm a 37° y fueron colectadas por centrifugación a $3800\text{ g}/15\text{ min}$ a 4°C y resuspendidas una solución que contiene Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 y sacarosa al 15 % + un volúmen igual de una solución de lisozima 2 mg/ml. Se mantiene en frío por 20 min y se adiciona un solución de lisis que contiene 12 ml de NaOH 0.2 M, + SDS al 1 %; se mezcla por inversión y se mantiene en hielo 10

min. Transcurrido este tiempo se e agrega 3.75 ml de acetato de sodio 3M pH 4.6 mezclando cuidadosamente por inversión e incubando en hielo 20 min. Se centrifuga a 15 700 g 30 min para recuperar en este momento el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico y. eliminar el RNA contaminante en la preparación se agrega RNAsa en una concentración final de 10 µg /ml del sobrenadante y se incuba 30 min a 37°C. Para purificar el plásmido se adiciona un volumen de fenol más un volumen de cloroformo por cada volumen de fase acuosa obtenida en el paso anterior, agitando vigorosamente y centrifugando a 15 700 g /20 min. Finalmente, el sobrenadante se precipita con isopropanol frío en una relación de 1:1 manteniendo a una temperatura de -30° C y centrifugando a la velocidad y tiempo anteriormente marcada para concentrar el DNA y la pastilla se solubiliza en 1.6 ml de H₂O, una ultima purificación de proteínas se realizó precipitando este soluble con 2 ml de polietilenglicol al 13 % y NaCl 400 mM. Se centrifuga a 15 700 g /10 min a 4°C obteniendo finalmente el DNA del plásmido que se resuspende en un volumen de ~500 µl de agua.

Obtención de los insertos

Se preparó una mezcla de digestión tomando una alícuota de la muestra de interés al que se le adiciona 1/10 del volumen del amortiguador adecuado a la enzima usada en cada caso. Para la G72 se usaron las enzimas XbaI (Gibco) + EcoRI(Gibco). Para G92 se trabajó con XbaI , y GADPH fué digerido con las enzimas XbaI más PstI (Gibco). La cantidad de enzima requerida se calcula tomando en cuenta que 1 unidad de endonucleasa digiere 1 µg de λ DNA a 37°C

durante 1 h. La reacción se detiene mediante la adición del amortiguador de carga de electroforesis que contiene azul de bromofenol al 2%, TAE 5x, EDTA 100mM y glicerol al 50%. Para comprobar la digestión del DNA, se corrieron estas muestras en geles de agarosa al 1 % según lo reportado por Johnson y Grossman (50).

Los insertos se obtuvieron mediante la técnica reportada por Dretzen (51) que donde después de digerir una aproximadamente de 10 μ g de DNA plasmidico con las enzimas de restricción adecuadas para liberar el inserto de cada plásmido este digerido y corrido en eungel completo de agarosa al 1% para ser separado y se tñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 μ g /ml , se hace un corte longitudinal por abajo de la banda de interés y en esta abertura se coloca un pequeño semicirculo de papel de DEAE celulosa (Whatman DE-81) previamente saturado con NaCl 2.5 M y lavado con agua esteril de 4-5 veces. Se aplica una corriente de 100 volts, el tiempo suficiente para que la banda se adhiera al papel, se corta el exceso de papel y se introduce en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml adicionando 300 μ l de una solución de NaCl 1.5 M en el amortiguador TE (Tris-HCl-10 mM pH 7.4 y EDTA 1mM pH 8.0) e incubando al menos 2 h a temperatura ambiente. El eluido se tranfiere a otro tubo de microcentrifuga de 1.5 ml mediante una leve centrifugación y posteriormente se hace la extracción del inserto con un volumen de fenol y un volumen de cloroformo para poder recuperar así la fase acuosa que contiene el DNA del inserto la cual se colecta y se precipita con dos volúmenes de etanol absoluto frío más 1/10 acetato de sodio 3 M pH 5 de durante toda la noche. Por ultimo se centrifuga en una microfuga durante 10 min y

se decanta el alcohol con mucho cuidado dejando secar la pequeña pastilla, que finalmente se solubiliza en 10 a 12 μ l de agua. Para comprobar la pureza del inserto extraído se corre en un gel de agarosa y el resto se guarda en congelación para el marcaje radiactivo para el análisis por northern blot.

RESULTADOS

Zimogramas con gelatina como sustrato

Gelatinasa A

Para averiguar la presencia de gelatinasas en el medio condicionado de fibroblastos obtenidos de pulmón humano se usó la técnica de electroforesis en SDS con gelatina incorporada como sustrato (zimografía). Los medios condicionados provenientes de fibroblastos de pulmón normal que incluyen a diferentes pasajes de la línea N2 (carriles 2, 3 y 4), LL-24 (carril 5), CCD25 (carril 6) y CCDILU (carril 7) se muestran en la Figura 1. Todos los medios mostraron una banda de actividad gelatinolítica de aproximadamente 72 kDa correspondiente a la progelatinasa A que se activa por el SDS. En algunos de los carriles se observa también una banda de ~ 68 kDa correspondiente a la enzima activa (N2,p=7, LL-24). En el carril 8 se observa el medio condicionado de la línea U2OS usada como control y que presenta un doblete de 72 y 68 kDa (progelatinasa y gelatinasa A) y una banda de 92 kDa (progelatinasa B). En el caso de los medios provenientes de fibroblastos de pulmón fibrótico, en la Figura 2 puede observarse que las líneas LL-29, LL-97, HIPF-40, HIPF-34, HIPF-33, HIPF-30, (carriles 2 a 7 respectivamente) muestran también una banda de actividad gelatinolítica de aproximadamente 72 kDa correspondiente a la progelatinasa A. En algunos de los carriles se observa también una banda de ~ 68 kDa correspondiente a la enzima activa (HIPF-33 y U2OS). En la Figura 3 se presentan medios provenientes de fibroblastos de pulmón normal (carriles 2 a 5) y fibrótico (carriles 6 y 7) corridos en el mismo gel con objeto de comparar la movilidad de las bandas de degradación de la gelatina. Como puede observarse la banda de progelatinasa A presenta la misma movilidad electroforética en ambos tipos de fibroblastos.

Gelatinasa B

En relación a la gelatinasa B en la figura 1 se observa que las líneas de fibroblastos normales N2 (pasajes 4, 5 y 7) y LL24 revelan bandas de degradación de gelatina de un peso molecular aparente semejante a la gelatinasa de 92 kDa que se observa en la línea U2OS usada como control. En la figura 2 también se observa en las líneas derivadas de pulmón fibrótico: HIPF-40, HIPF-34 y HIPF-30 bandas de degradación que podrían sugerir la presencia de gelatinasa B. Tanto en las figuras 1, 2 y 3 se observan bandas de alto peso molecular que corresponden a dímeros o agregados mayores de las enzimas.

Efecto de la estimulación con citocinas sobre la actividad gelatinolítica.

Se estimularon líneas de fibroblastos de pulmón normal y de pulmón fibrótico con diversas citocinas, con objeto de analizar si la estimulación encendía la producción de gelatinasa B o aumentaba la producción de gelatinasa A. En la Figura 4 se puede observar que en el caso de la línea LL 24 (pulmón normal) el estímulo con forbol miristato produce bandas de degradación de gelatina de menor peso molecular que podrían corresponder a formas activadas de la gelatinasa A (carril 3). La sustancia P también parece estimular la producción de esta enzima y sus formas activadas (carril 6). La interleucina 1 β , el TGF β y el LTC₄ no parecen producir ningún efecto. Finalmente cuando los fibroblastos se cultivaron sobre colágena tipo 1 no se observó ningún cambio en la producción de gelatinasas (carril 7). Por lo que se refiere a la gelatinasa B no se observó por este método la producción de actividad gelatinolítica que pudiera asociarse con la misma. El efecto de las mismas citocinas sobre líneas de fibroblastos de pulmón fibrótico fueron semejantes (no se muestra). Cuando los zimogramas (Figuras 1-4) se incubaron en presencia de EDTA 20 mM la actividad desapareció confirmando que se trata de metaloproteinasas.

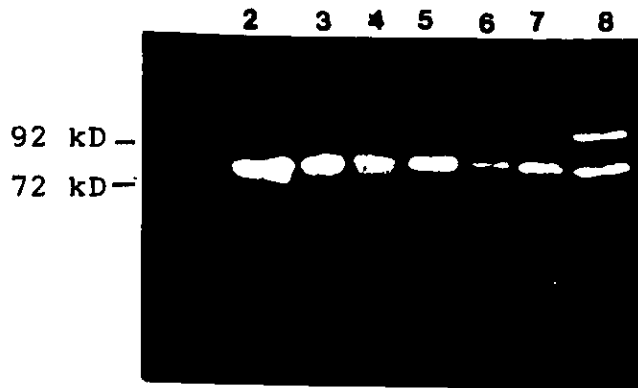


FIGURA 1

Zimograma con gelatina incorporada en el gel de medios condicionados derivados de fibroblastos de pulmón normal.

N2 (carriles 2, 3 y 4), LL-24 (carril 5), CCD25 (carril 6), CCDILU (carril 7). U2OS control, (carril 8)

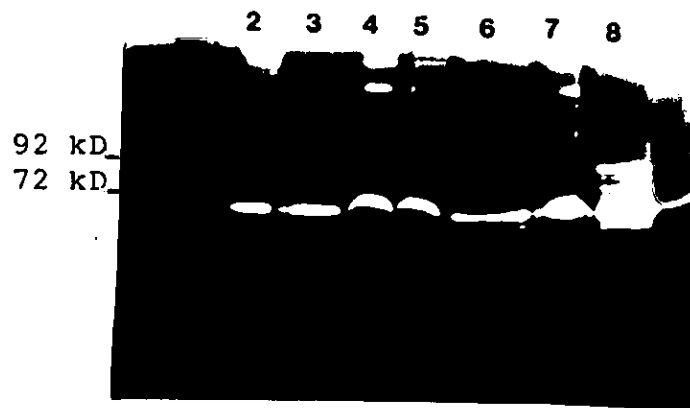


FIGURA 2

Zimograma con gelatina incorporada en el gel de medios condicionados derivados de fibroblastos de pulmón fibrótico

LL-29 (carril 2), LL-97 (carril 3), HIPF-40 (carril 4), HIPF-34 (carril 5), HIPF-33 (carril 6), HIPF-30 (carril 7). U2OS control, (carril 8)

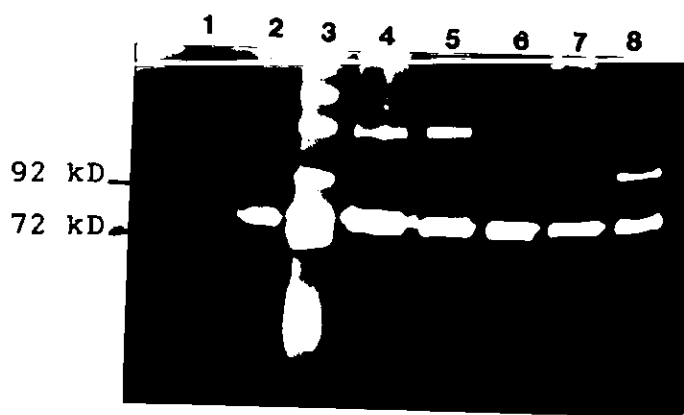


FIGURA 3

Zimograma con gelatina incorporada en el gel de medios condicionados derivados de fibroblastos de pulmón normal y fibrótico

P M (carril 1), CCDILU *normal* (carril 2), CCD25 *normal* (carril 3), LL24 *normal* (carril 4), N2 *normal* (carril 5), LL-29 *fibrótico* (carril 6), LL-97 *fibrótico*(carril 7). U2OS control, (carril 8)

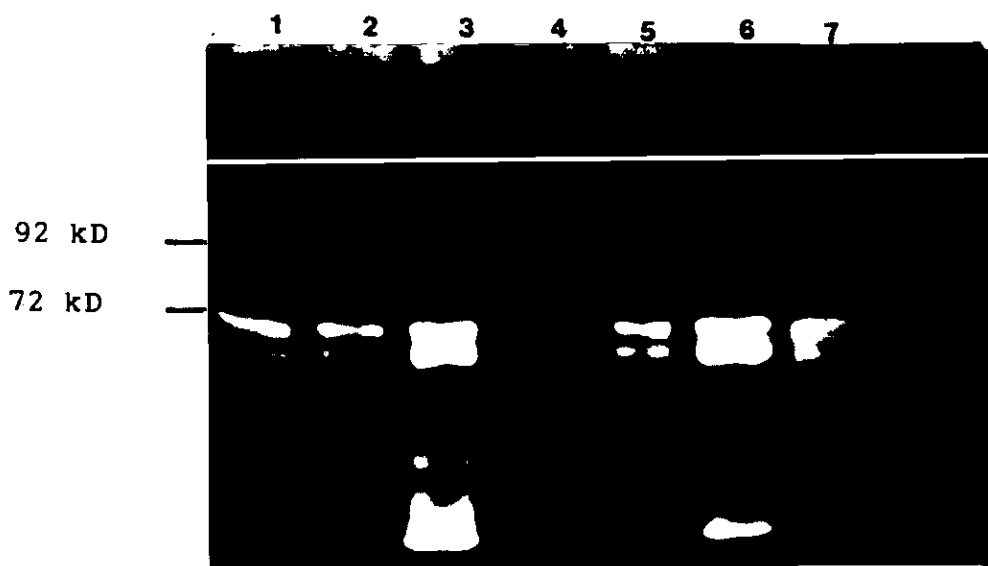


FIGURA 4

**Efecto de la estimulación con citocinas sobre la actividad gelatinolítica.
de fibroblastos de pulmón normal y fibrótico .**

LL-24 control (carril 1), + IL-1 β (carril 2), + PMA (carril 3), + TGF β (carril 4), + LTC4 (carril 5), + Sustancia P (carril 6), + Colágena tipo1 (carril 7)

Análisis de RNA mensajero para Gelatinasas A y B por Northern blot

Purificación de las sondas

Con objeto de probar si alguna de las bandas de actividad gelatinolítica que se observaron en los zimogramas correspondía a la gelatinasa B se procedió a realizar el análisis de los RNA mensajeros para ambas gelatinasas.

En la fig 5A se muestra la purificación del cDNA de la gelatinasa A de 72 kDa que tiene 3100 pb (carril 4) Este cDNA se obtuvo de la digestión del plásmido completo (carril 3) con Xba I y Eco RI. En el carril 5 se observa el vector pBluescript de 2900 pb

En la figura 5B se muestra la purificación del cDNA de la gelatinasa B de 92 kDa que tiene 2400 pb (carril 9) Este cDNA se obtuvo de la digestión del plásmido completo (carril 7) con Xba I . En el carril 8 se observa el producto de esta digestión correspondiente al inserto de 2400 pb mas el vector pBluescript de 2900 pb.

El mismo procedimiento se realizó para la sonda del gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH). En la Figura 5C se presenta el cDNA de 750 pb (carril 13). Para la obtención del inserto el plásmido completo (carril 11) se digirió con las enzimas de restricción XbaI y PstI (carril 12).

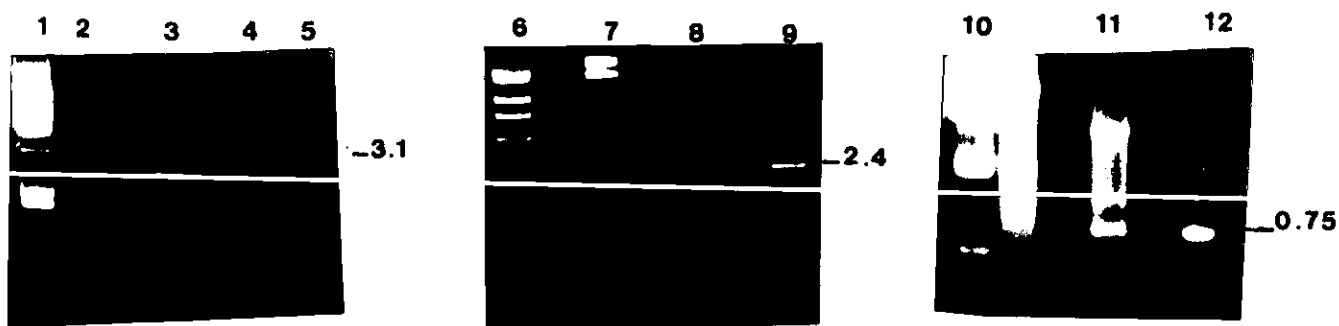


FIGURA 5

Aislamiento y obtención de las sondas de DNA de Gel A, Gel B y GAPDH.

5A: Plásmido completo (pBluescript + cDNA Gel A) (carril 2); plásmido digerido con XbaI (carril 3); inserto de Gel A de 3100 pb (carril 4); vector pBluescript (carril 5) **5B:** Plásmido completo (pBluescript + cDNA Gel B), (carril 7); plásmido digerido con XbaI y EcoRI (carril 8); inserto de Gel B 2400 pb (carril 9); **5C:** Plásmido completo (PBR 322 + cDNA GAPDH), (carril 11); plásmido digerido con XbaI y PstI (carril 12); inserto de GAPDH 750 pb (carril 12); Carriles 1, 6 y 10 fago λ cortado con Hind III.

Análisis por Northern blot

En la Figura 6A se muestra la expresión del RNA mensajero de gelatinasa A y de gelatinasa B en líneas de fibroblastos derivados de pulmón normal (N2, LL-24, CCDILU y CCD25) comparadas con el control U2OS. El transcrito de gelatinasa A y todas las líneas de fibroblastos lo expresaron sin diferencias significativas entre las mismas al comparar con la intensidad del RNA ribosomal (28S y 18S) que aparece en la figura 6B.

Por lo que se refiere a las líneas de fibroblastos de pulmón fibrótico (LL29, LL97, HIPF34, HIPF40) el resultado aparece en la Figura 7. Igual que en el caso de las líneas de pulmón normal no se observaron diferencias significativas en la gelatinasa A cuando se comparó con la expresión del gene constitutivo GADPH. Por otro lado en relación a la gelatinasa B solo el control U2OS mostró el transcrito para este mRNA. La estimulación con PMA no indujo aumento en la producción del RNA mensajero ni en las líneas de pulmón normal ni en las líneas de pulmón fibrótico. En la Figura 8 se ejemplifica para la línea LL-29 (fibrótico) y para la línea N2 (normal). Por lo que se refiere a la gelatinasa B el estímulo con PMA no mostró inducción del transcrito correspondiente (no se muestra).

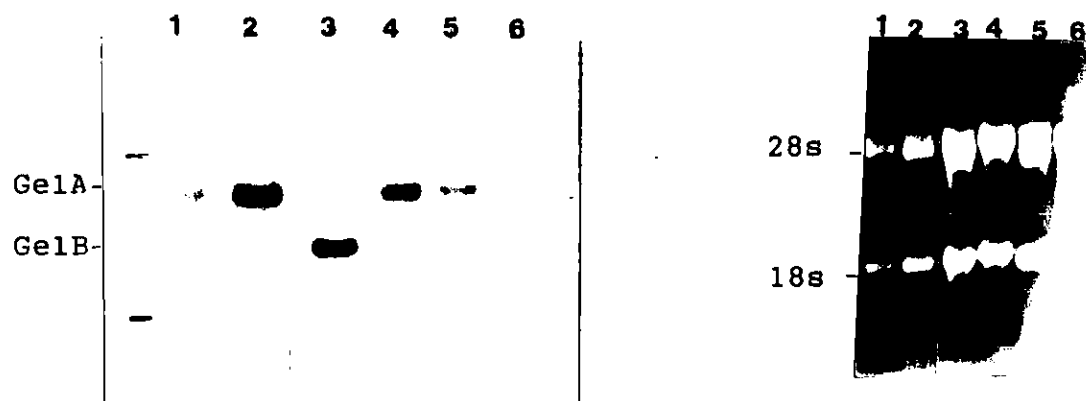


FIGURA 6

Northern Blot de RNA derivado de fibroblastos de pulmón normal e hibridado con cDNA de gelatinasa A y gelatinasa B

6A: N2 (carril 1 y 6); CCD25 (carril 2); U2OS (carril 3); LL-24 (carril 4); CCDILU (carril 5); transcrito de Gel A y en U2OS (carril 4) el transcrito de la gel B. 6B: Transferencia de RNA total de las mismas líneas que 6 A.

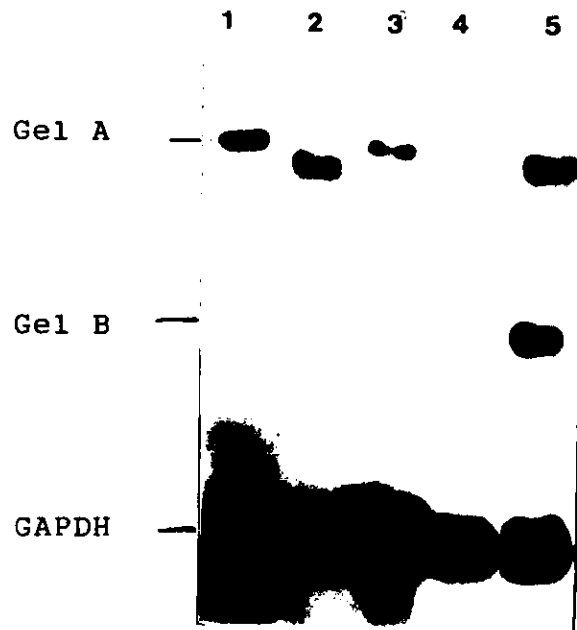


FIGURA 7

Northern Blot de RNA derivado de fibroblastos de pulmón fibrótico e hibridado con cDNA de gelatinasa A, gelatinasa B y GAPDH

LL29 (carril 1); LL97 (carril 2); HIPF34 (carril 3); HIPF40 (carril 4); U2OS (carril 5)

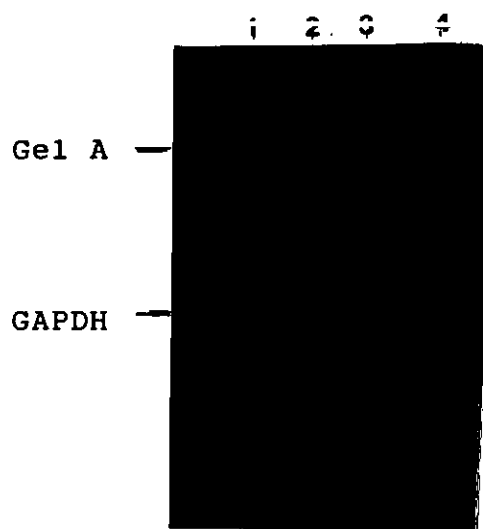


FIGURA 8

Northern Blot de RNA de fibroblastos de pulmón normal y fibrótico estimulados con PMA e hibridados con cDNA de gelatinasa A y GAPDH
LL29 (carril 1); LL29 + PMA (carril 2); N2 (carril 3); N2 + PMA (carril 4).

DISCUSION

La ruptura de membranas basales desempeña un papel crítico en el daño pulmonar tanto en el pulmonar agudo y crónico. En la fibrosis pulmonar idiopática y en el síndrome respiratorio pulmonar agudo (SIRPA) se ha mostrado discontinuidad en la distribución de colágena tipo IV y laminina desde etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad.(52). Mas aún, estudios morfométricos realizados en pulmones durante el desarrollo del daño alveolar difuso, han mostrado que la fibrosis intraalveolar se presenta en etapas proliferativas tempranas y que miofibroblastos activados migran a través de “hoyos” de la membrana basal epitelial (34). Por otro lado en el daño pulmonar inducido por bleomicina la presencia de cúmulos de fibrosis intraalveolar se ha asociado con discontinuidades en la membranas basales (35).

En este estudio decidimos explorar la expresión y actividad de las gelatinasas A y B en fibroblastos derivados tanto de pulmón normal como de pulmón fibrótico. Nuestros estudios mostraron que *in vitro* los fibroblastos independientemente de la fuente de obtención ya sea pulmón normal o con fibrosis pulmonar producen la gelatinasa de 72 kD, conocida como gelatinasa A.

Existe creciente evidencia que la gelatinasa A se expresa constitutivamente *in vitro* en la mayoría de los sistemas de cultivo de fibroblastos. Además otros tipos celulares como neumocitos tipo II, macrófagos, y otras estirpes celulares son capaces de producir esta enzima *in vitro* (38-41).

El análisis de las regiones promotoras de la gelatinasa A han revelado la ausencia notable de una caja TATA y un sitio AP-1, recientemente se ha reportado un sitio de unión a p53, un factor de transcripción, que activa la expresión de esta enzima (53). Es notable que la mayor parte de los estudios enfocados a analizar la regulación de la expresión de la gelatinasa A han

sido infructuosos. En el caso de fibroblastos derivados de gingiva se ha mostrado que la progelatinasa A se regula positivamente por TGF- β pero no por PMA (54). En este estudio no observamos ningún efecto del TGF- β sobre la expresión de gelatinasa A, lo cual sugiere que existen diferencias en la regulación de la expresión en fibroblastos de diferentes tejidos. Por lo que se refiere al efecto del forbol miristato la región promotora de la gelatinasa A difiere marcadamente de otras regiones promotoras de metaloproteinasas en que no tiene elementos responsivos al PMA. (55). En el presente estudio un hallazgo interesante fue que aunque el PMA no tiene efecto sobre la expresión de la proenzima, parece tener efecto sobre la activación de la misma. En este sentido es de interés señalar que la progelatinasa A también difiere en los mecanismos de activación extracelular, ya que no es susceptible de activación por la plasmina u otras proteinasas pero puede ser activada por las metaloproteinasas de membrana MT1 MMP, y MT2 MMP (13-14). Una posible explicación de la activación observada por el PMA es que este promotor de tumores este induciendo alguna de las MT-MMPs en fibroblastos que a su vez activaría a la gelatinasa A.

Por lo que se refiere a la gelatinasa B los tipos celulares que producen esta MMP en pulmón, incluyen a las células epiteliales bronquiales, neumocitos tipo 2, neutrófilos y macrófagos entre otros (39-42). En este trabajo no fuimos capaces de detectar la expresión del mRNA ni la actividad de la enzima en fibroblastos derivados de pulmón normal o fibrótico. Se ha reportado que los fibroblastos sinoviales aislados de articulación reumatoide expresan constitutivamente gelatinasa de 92 kD (43); este dato nuevamente refleja la especificidad de tejido de poblaciones de fibroblastos. La expresión de la gelatinasa B es aumentada en una variedad de tipos celulares por el promotor de tumores forbol miristate acetato (PMA), así como por mediadores inflamatorios tales como el TNF- α , el factor de crecimiento epidérmico, y la interleucina-1 β ,

generalmente a través de una combinación de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales (56-58). Los mediadores de estas inducciones parecen ser elementos responsivos al PMA en la región promotora que se une al factor de transcripción AP-1. El promotor de la gelatinasa B tiene además sitios de unión Sp-1 y NF-kB (59, 60). Nuestros resultados fueron negativos al tratar de inducir la MMP-9 con PMA o con mediadores inflamatorios como la interleucina-1.

En conclusión nuestra hipótesis original de que los fibroblastos de pulmón fibrótico eran capaces de sintetizar gelatinasa B no pudo ser demostrada. Será importante desarrollar nuevos estudios para entender cuales son los mecanismos regulatorios que encienden la expresión de estas enzimas *in vivo*.

Referencias

1. Linsemayer TF. Collagen in Hay DE, editor. Cell Biology of extracellular matrix. New York Plenum Press, 1991.
2. Extracellular Matrix. Zern MA y Reid LM (Eds.) Marcel Dekker Inc., New York, 1993.
3. Matrisian LM. The matrix degrading metalloproteinases. BioEssays 14:455-463, 1992.
4. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases and lung injury. Braz J Med Biol Res 29:1109-1115, 1996.
5. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol 7:728-735, 1995.
6. Goldberg GI, Wilhem SM, Kromberger A, Bauer EA, Grant GA & Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation induced rat protein. J Biol Chem 261:6600-6605, 1986.
7. Hasty K.A., Pourmotabbed T.F., Goldberg G.I., Thompson J.P., Spinella D.G., Stevens R.M., and Mainardi C.L. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem. 265:11421-11424, 1990.
8. Freije JMP, Diez-Itza I, Balbín M, Sánchez LM, Blasco R, Tolivia J & López-Otín C. Molecular cloning and Expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. J Biol Chem 269: 16766-16773, 1994
9. Collier IE, Wilhem SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kromberger AM, Bauer EA, y Goldberg GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading membrane collagen. J Biol Chem 263:6579-6587, 1988.
10. Wilhem SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, & Goldberg GI. SV40-

transformed lung fibroblasts secrete a 92 kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal macrophages. *J Biol Chem* 264:17213-17221, 1989

11. Sirum KL, Brinckerhoff CE. Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochemistry*, 28: 8691-8698, 1989.

12. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348:699-704, 1990.

13. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, & Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature (London)* 370:61-65, 1994.

14. Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem*, 270: 23013-23020, 1995.

15. Will H., Hinzmann B. cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem* 231: 602-608, 1995.

16. Puente X. S., Pendas A.M., Llano E., Velasco G., Lopez-Otin. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* 56: 944-949, 1996.

17. Muller D, Quantin B, Gesnel MC, Millon-Collard R, Abecassis J., Breathnach R. The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *Biochem J*, 253, 187-192, 1988.

18. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem*, 268: 23824-23829, 1993.
19. Pendas A.M., Knauper V., Puente X.S., Llano E., Mattei M.G., Apte S., Murphy G., Lopez-Otin C.. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J Biol Chem* 272:4281-4286, 1997.
20. Cossins J., Dudgeon T.J., Catlin G., Gearing A.J., Clements J.M. Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 494-498. 1996.
21. Llano E, Pendás AM, Knäuper V, Sorsa T, Salo T, Salido E, Murphy G, Simmer JP, Bartlett JD, López Otín C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry*, 36: 15101-16108, 1997.
22. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J of Cell Biochem* 53:288-295, 1993.
23. Cao J., Sato H., Takino T., Seiki M: The C terminal region of membrane-type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for progelatinase A activation. *J Biol Chem*, 270: 801-805, 1995
24. Gómez D., Alonso D, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue Inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J. Cell Biol.* 1997, 74: 11-122, 1997.
25. Selman M, Montaña M, Ramos C, Vanda B, Becerril C, Delgado J, Sansores R, Barrios R, Pardo A. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase, *Am J Physiol* 271:L734-L743, 1996.

26. Pardo A, Selman M, Ridge K, Barrios R, Sznajder JI. Increased expression of gelatinases and collagenase in rat lungs exposed to 100% oxygen. *Am J of Resp Crit Care Med*, 154:1067-1075, 1996.
27. Pardo A, Selman M. Proteinase-antiproteinase imbalance in the pathogenesis of Emphysema. The role of metalloproteinases in the lung damage. *Histology & Histopathology* 1998 en prensa.
28. Selman M, Pardo A. Pathogenic mechanisms in the development of diffuse pulmonary fibrosis. *Braz J Med Biol Res* 29:1117-1126, 1996.
29. Crystal, R. G., Ferrans, V.J., Dasset, F. *Biologic basis of pulmonary fibrosis. The Lung: Scientific Foundations* eds.RG. Crystal, JB West Raven Press Lid. NY. 2031-2048, 1991.
30. Uhal B., Joshi I., Mundle S., Raza A., Pardo A., Selman M. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol* 269 :L819-L828, 1995.
31. Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 259:L159-L184, 1990.
32. Bienkowski RS, Gotkin MG. Control of collagen deposition in mammalian lung. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209:118-135, 1995.
33. Selman M, Montaño M, Ramos C, Barrios R, Pérez-Tamayo R. Experimental pulmonary fibrosis induced by paraquat plus oxygen in rats: a morphological and biochemical sequential study. *Exp. Molec. Pathol.* 50:147-166, 1989.
34. Vracko R. Significance of basal lamina for regeneration of injured lung. *Virchows Arch. A.* 355:264, 1972.
35. Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, Striker GE: Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 131:281-289, 1985.

36. Yurchenco PD, Schittny JG: Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 1990, 4:1577-1590.
37. Pardo A, Selman M. The collagenase gene family. Relationships between collagenolytic activity and fibrogenesis. In: *Interstitial Pulmonary Diseases. Selected Topics*. M. Selman, R. Barrios eds., CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, 1991, pp 75.
38. Pardo A, Barrios R, Maldonado V, Meléndez J, Pérez J, Ruiz V, Segura L, Sznajder JI, Selman M. Gelatinases A and B are upregulated in lung rats by subacute hyperoxia. Pathogenetic implications. *Am J Pathol* 1998 (en prensa)
39. Pardo A, Selman M, Ramírez R, Ramos C, Montaña M, Stricklin G, Raghu G. Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs. *Chest* 102:1085-1089, 1992.
40. Pardo A, Ridge K, Uhal B, Sznajder JI, Selman M: Lung alveolar epithelial cells synthesize interstitial collagenase and gelatinases A and B in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 901-910, 1997.
41. Yao PM, Buhler JM, d'Ortho MP, Lebargy F, Delclaux C, Harf A, Lafuma C. Expression of matrix metalloproteinases A and b by cultured epithelial cells from bronchial explants. *J. Biol Chem* 271: 15580-15589, 1996.
42. Stahle-Backdahl M, Guidice GJ, Parks WC. 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest* 93: 2022-2030, 1994.
43. Unemori EN, Hibbs MS, Amento EP. Constitutive expression of a 92-kD Gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines. *J Clin Invest* 88: 1656-1662, 1991.

44. Gum R, Lengyel E, Juarez J, Hshiang J, Sato H, Seiki M, Boyd D. Stimulation of 92-kDa Gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem* 271: 10672-10680, 1996.
45. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acidic guanidiniumthiocyanate phenol- chloroform extraction. *Anal. Biochem* 162:156-159, 1987.
46. Thomas P.S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201-5205, 1980.
47. Feinberg A.P., Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem* 132:6-13, 1983.
48. Hanahan D: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol. Biol* 166:557-580, 1983.
49. Birhoim H.C., Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *nucleic Acids Res.* 7:1513-1523, 1979.
50. Johnson P.H., Grossman L.I. Electroforesis of DNA in agarose gels. Optimizing separation of conformational isomeres of double and single -stranded DNAs. *16:4217-4220*, 1977.
51. Dretzen G.M., Bellard, P., Sassone- Corsi, P., Chambon A, reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal Biochem.* 112: 295-298, 1977.
52. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV , Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD: Immunohistochemical study with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 149:1241-1256, 1996.
53. Bian J, Sun, Y: Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase

(gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol Cell Biol* 17: 6330-6338, 1997.

54. Overall CM, Wran JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 264:1860-1869, 1989.

55. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 265: 11077-11082, 1990.

56. Mauviel A . Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 53:288-295, 1993.

57. Vincenti MP, Coon CI, Lee O, & Brinckerhoff C Regulation of collagenase gene expression by IL1- β require transcriptional and postranscriptional mechanisms. *Nucleic Acids Research* 22:4818-4827, 1994.

58. Mackay R., Ballin M., Pelina D., Farina A., Nason A., Hartzler L., Thorgeirsson. Effect of Phorbol Ester and Cytokines on Matrix Metalloproteinase Expression in Tumor and Normal Cell Lines. *Ivasion. Metastasis.* 12, 168-184. 1992

59. Sato H & Seiki M. Regulatory mechanisms of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumour cells *Oncogene* 8: 395-405. 1993.

60. Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K: Complete structure of the human gene for 92 kDa type IV collagenase. *J Biol Chem* 266: 16485-16490, 1991.