

47
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**EXPRESION DE LA METALOPROTEINASA
ASOCIADA A MEMBRANA TIPO 3 (MT-MMP 3) EN
FIBROBLASTOS DE PULMON DE COBAYO
(*Cavia porcellus*).**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
JORGE ANTONIO GARCIA ALVAREZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FOLIOS DE ORIGEN

2000



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C Virginia Abrin Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" Expresión de la metaloproteinasa asociada a mebrana tipo 3 (MT-
MMP 3) en fibroblastos de pulmón de cobayo (Cavia porcellus)."
realizado por García Alvarez Jorge Antonio

con número de cuenta 9032567-2 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Annie Pardo Semo

A Pardo

Propietario

M. en C. Moises Selman Lama

M Selman

Propietario

M. en C. Jorge Meléndez Zajala

J Melendez

Suplente

M. en C. Remedios Ramírez Rangel

Remedios Ramirez Rangel

Suplente

Biol. Victor Ruiz López

X

Consejo Departamental de Biología.

Edna María Suárez Díaz
Dra. Edna María Suárez Díaz

*A mi madre, Georgina con muchísimo cariño.
A mis hermanos Víctor y Beatriz, por todo su apoyo.*

*A mi esposa, Claudia Alejandra por todas las locuras compartidas.
A mi hijo, Jorge Jair que es la ilusión de mi vida.*

*A mis pequeños Karen, Carlitos y Lizbeth, en quienes
tengo sembradas miles de esperanzas.*

Agradecimientos.

A la persona que me involucro directamente en la investigación y a quien admiro enormemente, la Dra. Annie Pardo Semo, con quien ha sido un honor trabajar y a quien una vez más le agradezco todas las atenciones que ha tenido conmigo.

Al Dr. Moisés Selman, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A mi maestra y amiga Remedios Ramírez por todas las enseñanzas, por la confianza y apoyo que me ha brindado durante mi estancia en el laboratorio.

Al M.en C. Jorge Meléndez y a la Dra. Vilma Maldonado por sus consejos para el desarrollo del trabajo y el análisis de resultados.

A mi amigo Víctor Ruíz, quien siempre ha sido muy paciente conmigo y sobre todo cuando me enseñó las técnicas de transcripción inversa y PCR, y a los miembros del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

A todo el personal del laboratorio de Fibrosis Pulmonar del INER, en especial a Carina y Javier, quienes me auxiliaron en la técnica de northern blot.

Al Dr. Alfonso Torre Blanco, a la M. en C. Angélica González y a la Biol. Isabel De la Cruz por sus consejos sobre PCR.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias, quienes siempre confiaron en mí: Víctor, Jesús, Tere, Isabel, Benjamín y Juan Carlos.

A todos los profesores que de alguna forma u otra, han sembrado en mí la semilla del conocimiento, en especial a la maestra que me encamino hacia la carrera de biología: la bióloga Carlota Estrada Bernal, de quien estoy muy agradecido por todos sus consejos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual me ha brindado absolutamente todo, para mi formación académica.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| <u>Introducción</u> | 1 |
| <i>La matriz extracelular</i> | 1 |
| <i>La familia de la metaloproteinasas</i> | 2 |
| <i>Las metaloproteinasas asociadas a membrana</i> | 5 |
| <i>Metaloproteinasa asociada a membrana tipo 3 (MT3-MMP)</i> | 8 |
| <u>Material y métodos</u> | 13 |
| <i>Material biológico</i> | 13 |
| <i>El cultivo</i> | 13 |
| <i>Extracción de ácido ribonucleico (RNA)</i> | 14 |
| <i>Cuantificación en gel de agarosa</i> | 15 |
| <i>Transcripción inversa</i> | 15 |
| <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> | 17 |
| <i>Los iniciadores (primers)</i> | 17 |
| <i>La reacción</i> | 18 |
| <i>Purificación de los productos</i> | 19 |
| <i>Secuenciación</i> | 20 |
| <i>Análisis tipo Northern blot</i> | 21 |
| <i>Separación en gel de agarosa y transferencia</i> | 21 |
| <i>Prehibridación</i> | 21 |
| <i>Marcaje de la sonda</i> | 22 |
| <i>Hibridación</i> | 23 |
| <i>Lavado de la membrana</i> | 24 |
| <i>Autorradiografía</i> | 25 |
| <u>Resultados</u> | 26 |
| <i>Extracción de RNA</i> | 26 |
| <i>RT-PCR</i> | 26 |
| <i>Secuenciación</i> | 27 |
| <i>Northern blot</i> | 33 |
| <u>Discusión</u> | 34 |
| <u>Referencias</u> | 37 |

*

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México y en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, bajo la dirección de la Dra. Annie Pardo Semo.

INTRODUCCION

a. La matriz extracelular.

La matriz extracelular desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares, en la conservación de la forma de su cuerpo y de sus órganos. Sin embargo, este material estructural está lejos de ser una sustancia de soporte inerte como se pensaba en el pasado, por el contrario, la matriz desempeña un papel activo y complejo en la regulación de procesos básicos de las células que tienen contacto con ella, ejerciendo un profundo efecto en su desarrollo, migración, proliferación, diferenciación, forma y funciones metabólicas.

La matriz extracelular está conformada por una gran variedad de moléculas y su composición estructural básica comprende, entre otras, a las colágenas que son las responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, la elastina que le confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad, y los proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad. Asimismo, para mantener esta estructura, existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz (1).

La matriz extracelular en animales adultos, se encuentra sometida a un recambio continuo que depende de las diferentes condiciones fisiológicas en distintos órganos. Los componentes de la matriz son degradados por enzimas proteolíticas extracelulares que son secretadas localmente por diferentes tipos

celulares. Numerosos estudios sugieren que la familia de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs de su abreviatura en inglés *Matrix Metalloproteinases*), son los mediadores fisiológicos más importantes en la remodelación de la matriz extracelular (2, 3).

El conocimiento relacionado con el número y tipo de moléculas que constituyen la matriz y las funciones que desempeñan en condiciones fisiológicas, así como su papel en algunas enfermedades hereditarias o adquiridas ha aumentado en los últimos años. Así por ejemplo, la artritis reumatoide, la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, la invasividad de algunos cánceres, el enfisema pulmonar y la arteroesclerosis, representan enfermedades en las cuales la matriz extracelular así como las enzimas que la degradan, están involucradas (1).

b. La familia de las metaloproteinasas.

La familia de las MMPs consiste de numerosas enzimas estructuralmente relacionadas capaces de digerir diferentes macromoléculas de la matriz extracelular. A la fecha, se han clonado por lo menos dieciocho miembros diferentes de esta familia que tienen en común un dominio propeptídico y un dominio catalítico de unión al zinc (2,3).

Los dominios que se han encontrado en estas enzimas y que han dado lugar a una clasificación de las MMPs son los siguientes:

1) Un dominio propeptídico, responsable de la latencia de las proenzimas, éste

contiene un residuo de cisteína que forma un compuesto coordinado con el zinc presente en el dominio catalítico. Así en la proenzima el dominio catalítico está enmascarado y el zimógeno es inactivo.

- 2) Un dominio catalítico esencial para la actividad enzimática que contiene los sitios de unión al calcio y al zinc.
- 3) Una secuencia rica en prolina que funciona como bisagra.
- 4) Un dominio carboxilo terminal semejante a hemopexina (llamado así, debido a que muestra una secuencia similar a la proteína de plasma: hemopexina).
- 5) Un dominio de unión a membrana.

Dependiendo de la estructura de dominios y de la afinidad de sustrato se han clasificado a las MMPs en cuatro subgrupos que incluyen a las colagenasas, estromelisin, gelatinasas y metaloproteinasas asociadas a membrana. En la Tabla 1 se presentan los distintos miembros que constituyen estos subgrupos. La nomenclatura de estas enzimas ha variado con el tiempo y conforme se iban descubriendo nuevas enzimas se les daba un número progresivo, sin embargo recientemente se acordó darles dicha progresión solo a aquellas a las que se les encuentra su equivalente en el humano (4).

Las MMPs están reguladas a diferentes niveles que incluyen 1) el control de transcripción, 2) la activación extracelular de las proenzimas, ya que son expresadas como zimógenos inactivos y 3) la inhibición de las enzimas activas.

Los activadores fisiológicos *in vivo* de muchas de estas enzimas permanecen desconocidos; sin embargo, se ha sugerido la existencia de una cascada en la que algunos de los miembros de la familia de las MMPs tienen la capacidad de activar a otros miembros de la misma familia (2, 5, 6).

Por otro lado, la actividad enzimática de las metaloproteinasas se inhibe por uno o más miembros de la familia de los inhibidores de metaloproteinasas llamados inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP, del inglés *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*), de los cuales cuatro diferentes miembros han sido clonados (TIMPs 1, 2, 3 y 4) (2, 5).

TABLA 1
FAMILIA DE MMPs.

| ENZIMA | No. DE MMP | SUSTRATO |
|--|--------------------------------------|--|
| <u>COLAGENASAS</u> Colagena intersticial Colagenasa de PMN Colagenasa-3 | MMP-1 MMP-8 MMP-13 | Colagenasa intersticial: I,II, III, VII, VIII, X, colágena fibrilar, gelatinas, fibronectina, proteoglicanos |
| <u>GELATINASAS</u> Gelatinasa de 72 kDa (A) Gelatinasa de 92 kDa (B) | MMP-2 MMP-9 | Colágena desnaturalizada (gelatina), elastina, colágenas nativas IV, V, VII, X y fibronectina. |
| <u>ESTROMELISINAS</u> Estromelisinasa-1 Estromelisinasa-2 Estromelisinasa-3 Enamelisinasa | MMP-3 MMP-10 MMP-11 MMP-20 | Proteoglicanos, fibronectina elastina, colágenas IV, V, IX, X, lamininas. Proteína dental. |
| <u>OTRAS</u> Matrilisina Metaloelastasa | MMP-7 MMP-12 | Proteoglicanos, elastina, colágena tipo IV, gelatina. |
| <u>MT MMPs</u> MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP | MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 | Colágena fibrilar, gelatina, pro-gelatinasa A, caseína. ¿? |

c. Las metaloproteinasas asociadas a membrana.

Recientemente cuatro MMPs asociadas a membranas (MT-MMP) han sido clonadas. Estas enzimas son únicas dentro de la familia de las MMPs, ya que se encuentran asociadas a la membrana celular y no son secretadas al espacio extracelular como el resto de los miembros de la familia.

La metaloproteinasas asociada a membrana tipo 1 (MT1-MMP) fue

aislada de una biblioteca de cDNA de placenta humana. El cDNA obtenido tiene una longitud de 3.4Kb y la proteína traducida es de 582 aminoácidos (7). La MT2-MMP fue aislada de una biblioteca de cDNA de pulmón humano. Esta consiste de 3.5 Kb y su producto génico consiste de 669 aminoácidos. Se expresa predominantemente en pulmón, placenta, riñón, ovario, intestino y prostata (8). La MT3-MMP al igual que la MT1-MMP fue aislada de una biblioteca de cDNA de placenta humana, es predominante en cerebro y posee un cDNA de 2.1 Kb con una proteína deducida 604 aminoácidos (9). La MT4-MMP fue clonada de una librería de cDNA de cáncer de mama, el cDNA aislado consiste de 1.5 Kb., que da origen a una proteína de 518 aminoácidos; se ha localizado su expresión en cerebro, leucocitos, colon, ovario y testículo (10).

Estas enzimas poseen un sitio de inserción entre el dominio propeptídico y el dominio catalítico que posee una secuencia de aminoácidos característica la cual es RXKR, y que es llamada sitio de reconocimiento furina, cuya función es la de establecer un sitio de corte del dominio propeptídico para que la enzima adquiera actividad catalítica, lo cual ocurre por convertasas tipo furina (11,12).

Una anécdota curiosa se suscito cuando Takino y cols. reportaron el descubrimiento de una nueva MT-MMP, a la cual le asignaron el nombre de MT2-MMP. Antes de que ellos publicaran su artículo, Will y cols. publicaron el suyo con el descubrimiento de otra MT-MMP a la cual llamaron también MT2-

MMP; así que para evitar confusiones, durante las conferencias Gordon Research sobre metaloproteinasas de matriz, se organizó la nomenclatura para designar los nombres a ambas enzimas, quedando como MT2-MMP la descubierta por Will y Hinzmann y como MT3-MMP la descubierta por Takino y cols.

Mientras que la función de la MT4-MMP, es incierta aún, las MT1-MMP, MT2-MMP y MT3-MMP tienen la capacidad de activar a la gelatinasa A también llamada MMP-2. La MMP-2 es única entre las MMPs ya que no presenta una secuencia susceptible de activación proteolítica por serin proteinasas. El mecanismo de activación de progelatinasa A es de gran importancia en algunas patologías como las metastasis tumorales, que presentan un aumento en la actividad de la MMP-2. Por lo tanto se ha sugerido, que las MT-MMPs pueden tener un papel importante en la diseminación de los tumores.

Cao y cols. (1996) han propuesto un modelo, el cual se reproduce en la fig. 1. Se propone que la MT1-MMP requiere de un proceso de activación, a la fecha desconocido, que logra una vez que se completa su transporte en el aparato de Golgi. Una vez activada y anclada en la membrana celular, forma un complejo con TIMP-2; dicho complejo actúa cuando TIMP-2 se encuentra en bajas concentraciones, ya que si se incrementa la concentración de éste, se inhibe la actividad de la MT1-MMP. A continuación, la progelatinasa A se une a la MT1-MMP y TIMP-2 formando de esta manera un complejo ternario, en donde como resultado, la progelatinasa A pasa a su forma activa (gelatinasa A) (12,13,14).

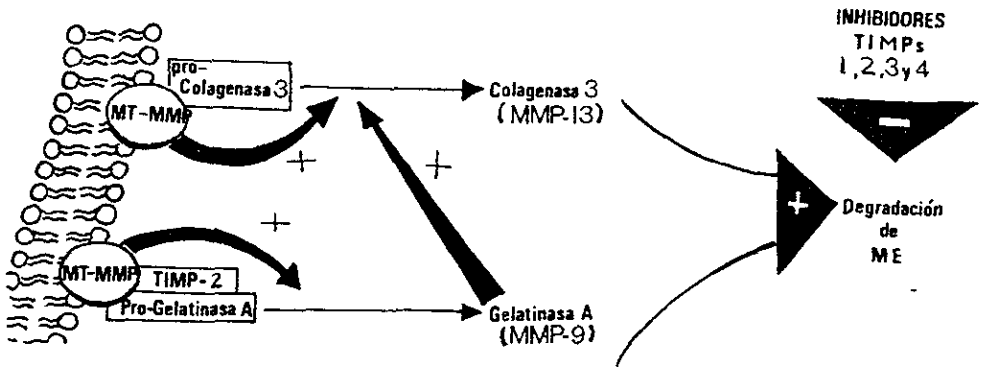


Fig. 1 Modelo propuesto por Cao y cols. (1996) de activación de la gelatinasa A (MMP-9) mediante la participación de las MT-MMPs y TIMP-2 .

d. Metaloproteinasas asociadas a membrana tipo 3 (MT3-MMP).

Como ya se mencionó anteriormente, la MT3-MMP fue aislada de una biblioteca de cDNA de placenta humana. El cDNA aislado tiene una longitud de 2.1 Kb en su marco de lectura, el cual es suficiente para codificar dicha enzima. Sin embargo, el transcrito en tejidos o líneas celulares es de 12 Kb (corroborado por northern blot). El cDNA carece de la típica señal de poliadenilación (AATAAA), en la región 3' no codificante del gene. El tamaño de su transcrito es muy diferente al de la MT1-MMP, el cual es de 4.5 Kb.; una explicación posible para la diferencia de los tamaños en los mRNA es la diferente longitud de las regiones no codificantes en sus extremos terminales 3'.

La MT3-MMP presenta una secuencia de aminoácidos estrechamente relacionada con la MT1-MMP (66% de identidad en el dominio

catalítico). Presenta los tres insertos característicos de las MT-MMPs que no se encuentran en el resto de los miembros de la familia de las MMPs (9). Un inserto (IS-1) entre el propéptido y el dominio catalítico contiene la secuencia de aminoácidos conservada RXKR (sitio furina, como ya se había mencionado anteriormente). Una inserción similar existe en estromelisin-3 pero no en otras MMPs (11,12). Después existe un inserto de ocho aminoácidos (IS-2) en el dominio catalítico. Tres de los ocho aminoácidos se encuentran conservados en ambas (MT1 y MT3). El significado de esta inserción no es claro, quizá pueda modular la especificidad del sustrato de las enzimas desde esta posición en el dominio catalítico como ocurre en el dominio de unión a la gelatina de las gelatinasas. Cabe mencionar que este sitio de inserción no se encuentra en las MT2 y MT4 MMP.

Las secuencias adicionales (IS-3) contienen el dominio transmembranal al final del dominio tipo hemopexina. Al igual que las MT1, MT2 y MT4-MMP, la MT3-MMP se expresa como una proteína de membrana con dominio transmembranal (TM) en el carboxilo terminal.

Se ha reportado que la expresión de la MT3-MMP en células COS-1 y células HT1080 de fibrosarcoma induce una activación de progelatinasa A (9). La MT3-MMP a diferencia de la MT-1 MMP, se expresa abundantemente en tejido nervioso, lo cual sugiere algún papel específico de esta enzima en el sistema nervioso central.

El cDNA de la MT3-MMP obtenido de mRNA de ovario humano, mostró una estructura primaria ligeramente diferente (5 %) de la que se reportó originalmente. Esto podría explicarse por polimorfismo del gene. Una discrepancia similar fue reportada entre la MT1-MMP aislada de placenta y la aislada de pulmón (15).

Recientemente se han realizado estudios sobre la posible actividad enzimática de la MT3-MMP utilizando una variante de 150 aminoácidos más pequeña que la original. Esta variante llamada SM3, obtenida por empalme alternativo carece del dominio transmembranal. La región carboxilo terminal de las MMP's llamada dominio tipo hemopexina, se considera que está formado a partir de 4 exones. El punto de empalme de la SM3, después de la lisina 407, correlaciona bien con el conocido punto de unión del segundo y tercer exón en el dominio tipo hemopexina. Varios tamaños de productos de mRNA han sido ocasionalmente reportados en la familia de las MMP's, como sucede en la MMP-9 humana. Estos productos pueden ser el resultado de diferentes sitios de poliadenilación en el extremo 3' de dichos genes (15).

Cuando la SM3 se expresó en células COS-7, pudo ser significativamente detectada en el medio condicionado. Por otro lado, fue mucho más difícil detectar la señal en la fracción celular del lisado, sugiriendo que la SM3 se secreta al medio. La SM3 expresada en *Escherichia coli* (SM3-e) fué utilizada para la caracterización de esta enzima. Se encontró que el TIMP-2 tiene 10 veces mayor actividad inhibitoria que el TIMP-1 sobre SM3-e. Dicha enzima

tiene la habilidad de activar proMMP-2, pero no proMMP-9, y la actividad para activar proMMP-2 fue completamente inhibida por TIMP-2 pero no por TIMP-1. A pesar de que la SM3 tiene una secuencia con 50 aminoácidos nuevos en el carboxilo terminal, 89% de la molécula incluido el llamado "dominio catalítico", es completamente idéntico a la MT3-MMP. Esto sugiere que la SM3 tiene una actividad enzimática muy similar a la MT3-MMP. La actividad enzimática de la MT3-MMP sobre las proteínas de la matriz extracelular es todavía desconocida debido a la dificultad que implica el purificar proteínas asociadas a membrana (15).

A pesar de que la expresión de MT3-MMP fue reportada por Takino y cols (9) en placenta humana, Matsumoto y cols (15) no pudieron detectar ninguna señal en placenta. Se ha sugerido que la expresión de la MT3-MMP está estrictamente controlada en momentos específicos de degradación o reconstrucción de tejidos como ocurre en la placenta. Esto sugiere que la expresión declina con el avance del desarrollo y que cuando se expresa en tejidos adultos es porque estos se encuentran en constante remodelación como se ha descrito en ovario y el intestino delgado (15).

Estudios realizados en nuestro laboratorio han sugerido la presencia de la enzima MT3-MMP en pulmón de cobayo. En nuestro laboratorio se han desarrollado diferentes modelos experimentales de enfermedades pulmonares en cobayo (*Cavia porcellus*) y en este contexto hemos estado interesados en clonar algunos miembros de la familia de las MMPs.

En el proceso de clonación de la colagenasa (MMP-1) en cobayo (datos no publicados, Meléndez y Pardo) se obtuvieron resultados compatibles con la expresión de esta enzima en pulmón de cobayo. En este contexto el propósito de la presente tesis fué determinar si fibroblastos de pulmón de cobayo expresan la MT3-MMP.

MATERIAL Y METODOS.

1.1 Material biológico

Los fibroblastos de cobayo provienen de una línea celular llamada JH4 clone 1 (lung, guinea pig), que fue adquirida en la *American Type Culture Collection* (ATCC).

1.2 El cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el Nutrient Mixture F-12 Ham, Kaighn's Modification (Medio F-12K), (SIGMA Biosciences). El medio fue suplementado con suero fetal bovino al 15% y antibiótico al 1% (100 U/ml de penicilina, 10 μ l/ml de estreptomina y 250 μ g/ml de anfotericina).

Las células fueron cultivadas en cajas T-75 (75 cm² de superficie) (COSTAR_R) a 37°C y atmósfera de 5% CO₂ 95% aire, en una incubadora (NAPCO_R model 6100). Se observó el crecimiento de las células con un microscopio invertido con iluminación por luz transmitida (Carl Zeiss_R).

Cuando las células alcanzaron confluencia temprana se cambiaron a medio libre de suero (control), y a otra caja T-75 con medio libre de suero + 5 x 10⁻⁴ M de phorbol, 12-miristato, 13-acetato (PMA) en dimetil sulfóxido (DMSO). Las cajas se mantuvieron en estas condiciones por 24 horas.

1.3 Extracción de Acido Ribonucleico (RNA).

Pasadas las 24 horas correspondientes del experimento, se procedió a realizar la extracción de RNA con el reactivo TRIzol Reagent (GIBCO BRL). Esta técnica es una modificación de la reportada por Chomczynski & Sacchi (16). Los pasos que se siguieron se exponen a continuación:

- a) Se agregó trizol a las células (3ml).
- b) Se incubó a temperatura ambiente (5 minutos).
- c) Se adicionó 600µl de cloroformo frío, agitando vigorosamente por 2 minutos (0.2 ml cloroformo/1 ml de trizol).
- d) Se centrifugó a 10 000 rpm. a 4°C por 15 minutos en una centrífuga modelo J2-MC Beckman.
- e) Se recuperó la fase acuosa, transfiriéndola a otro tubo.
- f) Se adicionó un volumen igual al recuperado de isopropanol frío (aproximadamente 5 a 6 ml).
- g) Se cubrió con parafilm, incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- h) Se hizo una nueva centrifugación a 10 000 rpm, a 4°C por 10 minutos.
- i) Se decantó el sobrenadante por inversión suave del tubo y se secó el exceso de líquido dejando el tubo invertido durante 5 minutos sobre gasa estéril.
- j) Se adicionó a la pastilla 1 ml de etanol al 75% frío, resuspendiendo con vortex.
- k) Se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm a 4°C por 10 minutos.
- l) Se decantó suavemente el sobrenadante, secando con gasa estéril o papel

secante.

- m) Se resuspendió en aproximadamente 40 μ l de TES (amortiguador de elución: Tris 10mM, EDTA 1mM, SDS 0.1%). 400 μ l por cada 10 ml de trizol.
- n) Se realizó la lectura en el espectrofotómetro, 1 μ l en 1 ml de TE a 260 y 280 nm, obteniendo la relación de lecturas: 260/280 (óptimo 1.8 - 2.2).
- o) Se calcularon μ g de RNA total (1 densidad óptica a 260 nm equivale a ~ 40 μ g).

1.4 Cuantificación en gel de agarosa.

Para verificar los valores obtenidos con el espectrofotómetro, se prepara un gel desnaturalizante que consistió en lo siguiente:

- Agarosa 0.375 gr
- H₂O DEPC 21.2 ml
- MOPS 12X 2.083 ml
- Formaldehído 1.35 ml

En este gel de agarosa al 1.5% se corrió un microlitro de cada muestra con su respectivo marcador de pesos moleculares de 0.24 - 9.5 Kb de RNA Ladder (GIBCO BRL).

1.5 Transcripción inversa.

Se utilizó el kit GeneAmp[®] RNA PCR Kit (Perkin Elmer) siguiendo las indicaciones sugeridas, utilizando hexámeros al azar y previo tratamiento de la

muestra de RNA con desoxiribonucleasa I (GIBCO BRL). El protocolo se indica a continuación:

- Se preparará la mezcla maestra (master mix) en el orden y en las proporciones que se muestra:

| Componente | Volumen (μl) | Concentración final |
|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Solución MgCl ₂ 25mM | 4 | 5 mM |
| Amortiguador PCR II 10X | 2 | 1X |
| Agua con DEPC | 2 | ----- |
| dGTP | 2 | 1 mM |
| dATP | 2 | 1 mM |
| dTTP | 2 | 1 mM |
| dCTP | 2 | 1 mM |
| Inhibidor de RNAsas | 1 | 1U/ μ l |
| MuLV Transcriptasa inv. | 1 | 2.5U/ μ l |
| Hexámeros al azar | 1 | 2.5 μ M |

A esta mezcla se le añadieron 2 μ l de muestra experimental.

- Los tubos se incubaron a temperatura ambiente 10 minutos; esto sirve para la alineación de los iniciadores hexaméricos al templado de RNA, por la transcriptasa inversa.
- Los iniciadores alineados son extendidos a una temperatura de reacción de 42°C por 15 minutos.
- Se incubó 5 minutos a 99°C para desnaturalizar a la enzima transcriptasa inversa.
- Se enfrió 5 minutos a 5°C.

1.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.6.1 Los iniciadores (primers).

Los iniciadores utilizados fueron los siguientes:

1-A 5'cgagaggtagctccaaatttaatgttcg3'
2-B 5'ttcctagtggtccatggctcatcggag3'

Estos primers (GIBCO BRL) , tienen una temperatura de alineación de 60-63°C, y proporcionan de manera teórica un producto de 377 pares de bases (p.b.). Fueron resuspendidos a una concentración 50 μ M y de ahí se hizo la dilución de trabajo a una concentración final de 10 μ M. Corresponden a una parte del dominio catalítico de un fragmento previamente clonado de la MT3-MMP de cobayo (Meiéndez y Pardo, datos no publicados), donde el primer iniciador estaría cercano al switch de cisteína.

1.6.2 La reacción.

Se estandarizaron las condiciones de la reacción y se siguió finalmente el siguiente protocolo:

| <i>Solución</i> | <i>Volumen (μl)</i> |
|----------------------------|------------------------------------|
| MgCl ₂ 25 mM | 0.75 |
| Amortiguador PCR II 10X | 1.5 |
| Iniciador 1-A (10 μ M) | 0.5 |
| Iniciador 2-B (10 μ M) | 0.5 |
| Amplitaq DNA polimerasa R | 0.5 |
| Agua desionizada estéril | 16.25 |

A la mezcla de reacción de 20 μ l, se agregaron 5 μ l de cDNA de células JH4 control ó de células JH4+PMA. Además se añadió otro tubo al cual en lugar de cDNA, se agrega mezcla de nucleótidos. Este control nos permite detectar la presencia de contaminación.

Las condiciones utilizadas en 30 ciclos en el termociclador (GeneAMP PCR System 2400, Perkin Elmer) fueron:

| Inicio | | ciclo | | termino |
|---------|--------|--------|-----------|---------|
| 105 seg | 15 seg | 30 seg | 7 minutos | |
| 95°C | 95°C | 60°C | 72°C | |

El producto obtenido se purificó y reamplificó para obtener una concentración adecuada para la secuenciación. La amplificación se realizó en las siguientes condiciones:

| Solución | Volumen (μl) |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| MgCl ₂ 25 mM | 1.0 |
| Amortiguador PCR II 10X | 2.0 |
| Iniciador 1-A (10 μ M) | 0.5 |
| Iniciador 2-B (10 μ M) | 0.5 |
| Amplitaq DNA polimerasa _R | 0.5 |
| Mezcla de nucleótidos | 6.0 |
| Agua destilada estéril | 13.5 |
| cDNA purificado | 1.0 |

1.6.3 Purificación de los productos.

Para purificar los productos de PCR, se utilizó el kit comercial GeneClean III (Bioselec). El protocolo fue el siguiente:

- Se extrajo manualmente la banda del gel de agarosa.
- Se adicionó tres volúmenes de Ioduro de Sodio 4M (4°C), incubando a 55°C durante 5 minutos.
- Se adicionó 7 μ l a cada tubo de Glass Milk_R (la cual es una matriz de sílice que

retiene a las moléculas de DNA), manteniendo en hielo.

- Posterior Incubación en hielo 5 minutos.
- Se centrifugó en microcentrifuga a máxima velocidad 10 segundos.
- Se desechó el sobrenadante cuidadosamente, sin tocar la pastilla.
- Se adicionó 300 μ l de New Wash (que es una solución la cual contiene NaCl, tris y EDTA, además de ser diluida con agua y etanol) a cada muestra.
- Posterior centrifugación 10 segundos en microcentrifuga a máxima velocidad.
- Se repitieron los dos pasos anteriores, dos veces cada uno en la misma secuencia.
- Se adicionó 10 μ l de agua destilada estéril, resuspendiendo e incubando a 55°C durante 5 minutos.
- Nueva centrifugación 1 minuto, recuperando el sobrenadante en un tubo limpio.
- Se repitieron los dos pasos anteriores y se juntó el sobrenadante.

1.6.4 Secuenciación.

La secuenciación automática se realizó de manera comercial en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en la Unidad de Biología Molecular.

1.7 Análisis tipo Northern blot.

1.7.1 Separación en gel de agarosa y transferencia.

En un gel desnaturizante de agarosa al 1% se corrieron 25 μ g de RNA proveniente de células JH4control y con PMA. Se corrió a un voltaje constante de 15 volts durante toda la noche.

Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nylon (Nytran) en una unidad de transferencia para electroforesis.

- Se utilizó buffer TAE 1X para enjuagar el gel. Este gel se enjuagó nuevamente con agua desionizada dos veces.
- Se colocó una membrana de nylon.
- Se incubó la unidad de transferencia TRANSFOR™ modelo TE 42 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.) a temperatura de 4°C, con 15 volts y 280 amperes, durante 10 horas. Para ello se utilizó una fuente de poder (BioRad 1000/500).
- El RNA fue fijado a la membrana con una fuente de rayos ultravioleta UVP Ultraviolet Crosslinker, modelo CL-1000.

1.7.2 Prehibridación.

La membrana de nylon se colocó en una bolsa de hibridación, en donde se adicionaron 20 ml de la siguiente solución:

| <i>Solución</i> | <i>Cantidad</i> |
|-----------------------------------|-----------------|
| Formamida | 10 ml |
| SSC 20X | 5 ml |
| Fosfato de sodio 1M pH 7 | 1 ml |
| SDS 20 % | 100 μ l |
| Denhart 100X | 1 ml |
| DNA esperma de salmón (5mg/ml) | 400 μ l |
| Agua desionizada estéril | 2.5 ml |

- Toda la solución se calentó en agua a ebullición durante 5 minutos.
- La solución caliente se depositó en las bolsas de hibridación y se sellaron.
- Se incubaron a 42°C, durante 24 horas y con agitación constante.

1.7.3 Marcaje de la sonda

Se utilizó el kit RTS Radprime DNA Labeling System (Life Technologies), bajo el siguiente protocolo:

- Se desnaturalizaron 25 μ g de DNA en 45 μ l de amortiguador TE calentando por 5 minutos en un baño de agua hirviendo. Se enfrió inmediatamente en hielo.
- En un tubo del kit se agregaron los 25 μ g de DNA desnaturalizado, utilizando vortex. La solución tomó un color azul uniforme.
- Se añadieron 5 μ l [α - 32P] dCTP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l), mezclándolos

suave pero firmemente. Posteriormente se centrifugó por 15-30 segundos.

- Se Incubó a 37°C por 10 minutos, deteniendo la reacción y adicionando 5 µl de EDTA 0.2 M.

Para limpiar la sonda marcada de los residuos de nucleotidos, se utilizaron columnas Quick Spin (TE)/ G-50 Sephadex,(GIBCO).

Posteriormente se cuantificaron las cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo, con el siguiente procedimiento:

- La sonda ya marcada, se aforó a un volumen de 100 µl con TE.
- Se leyeron las cpm de 2µl de esta resuspensión. Esta fue la lectura # 1.
- Los 100 µl se colocaron en la columna, centrifugándose 6 minutos a 4500 revoluciones por minuto (rpm).
- Se midió el volumen recuperado, valorando las cpm contenidas en 2 µl de la suspensión ya filtrada. Esta fue la lectura # 2.
- Se calculó el porcentaje de eficiencia con las dos lecturas obtenidas, el cual debe ser igual ó mayor de 30%.

En este caso, se obtuvo en la lectura #1: 1,152,094.8 cpm y en la lectura #2: 334,305.63 cpm. La eficiencia por lo tanto fué de 30%.

1.7.4 Hibridación.

La solución de prehibridación se sustituyó con la siguiente mezcla de hibridación:

| Solución | Cantidad |
|-----------------------------------|-----------------|
| Formamida | 10 ml |
| SSC 20X | 5 ml |
| Fosfato de sodio 1M pH 7 | 1 ml |
| Denhart | 200 μ l |
| Dextran sulfato al 50 % | 4 ml |
| DNA esperma de salmón (5mg/ml) | 800 μ l |

Más la dilución con la sonda marcada.

Se hirvió durante 5 minutos y posteriormente se agregó a la bolsa donde estaba contenida la membrana de nylon con el RNA. Se selló la bolsa, y se mantuvo a 42°C y agitación constante durante 24 horas.

1.7.5 Lavado de la membrana.

Se realizaron los siguientes lavados:

- 5 minutos a 42°C con SSC2X/0.1 SDS 20%
- 15 minutos a 42°C con SSC2X/0.1 SDS 20%
- 15 minutos a 55°C con SSC 0.5X/0.1 SDS 20% (dos lavados)
- 15 minutos a 65°C con SSC 0.1X/0.1 SDS 20%.

Finalmente se enjuagó la membrana con SSC 2X.

1.7.6 Autorradiografía.

Se utilizaron películas sensibles a ^{32}P BioMax MS con pantalla intensificadora, y se guardaron en un cassette X-Omat (Kodak) a una temperatura de -70°C en un periodo de cuatro días. La sonda utilizada fue el producto obtenido de PCR con los iniciadores 1-A y 2-B.

RESULTADOS.

Extracción de RNA

El resultado de la extracción de RNA total de fibroblastos de cobayo en condiciones basales y estimulados con PMA se muestra en la figura 2. En ella se puede observar que el RNA se encuentra íntegro y que la concentración obtenida fue semejante para los dos tratamientos.

Tomando como base las lecturas en el espectrofotómetro se procedió a hacer la transcripción re Tomando como base la concentración observada en el gel de agarosa y la inversa y la amplificación de la MT3-MMP.

RT-PCR

Como se describió en material y métodos, el ensayo de RT-PCR se realizó inicialmente utilizando 1 μ l de las muestras experimentales (cDNA), sin embargo como no se obtuvo ningún producto, en un segundo experimento se utilizaron 10 μ l de las muestras experimentales. El resultado obtenido se muestra en la Figura 3 donde se puede observar que en ambos casos en fibroblastos sin estimular (A) y estimulados con PMA (B) se obtuvo un producto que al compararlo con el marcador de pesos moleculares de DNA (carril 3) mostró un tamaño semejante al teóricamente esperado (377 pares de bases) Los productos amplificados, de ambas condiciones experimentales (controles y estimulados con PMA) mostraron diferencias en concentración. Siempre se observó una

concentración mayor en las muestras estimuladas sugiriendo que el PMA incrementó la expresión del gen en cuestión .(Figura 3).

Como en estas condiciones experimentales se notó un acentuado barrido que sugiere la presencia de productos inespecíficos, se hizo una nueva reacción donde se utilizó un volumen de 5 μ l de la muestra de RT con lo cual el barrido disminuyó notablemente (figura 4). Los productos se purificaron y se reamplificaron; una vez purificados se procedió a la secuenciación, y otra parte se utilizó en el northern blot.

Secuenciación

La secuenciación del producto de amplificación (MT3 cob) pudo mostrarnos 347 p.b. de las 377 que se esperaban, cuya secuencia se muestra en la Figura 5. Al comparar esta secuencia con la de la MT3-MMP humana se observó que existe un alto grado de homología con la parte de la secuencia que codifica para el dominio catalítico al cual correspondían los iniciadores utilizados. La secuencia de nucleótidos de MT3-MMP humana comparada con la secuencia obtenida de cobayo es igual en un 92.85% sugiriendo que la secuencia del producto de PCR corresponde a una parte de un gen que es homólogo al que codifica para la MT3-MMP humana.

| | | | | | |
|--------|-------------|------------|------------|------------|-------------|
| MT3Cob | NNNagaggta | gctccaaatt | taatgttcgt | cgaaagcggg | atgcattaac |
| MT3Hum | gacagaggta | gctccaaatt | tcatattcgt | cgaaagcgat | atgcattgac |
| | | | * * | * | * |
| MT3Cob | aggacagaag | tggcagcaca | agcatatcac | gtacagtata | aagaacgtaa |
| MT3Hum | aggacagaaa | tggcagcaca | agcacatcac | ttacagtata | aagaacgtaa |
| | * | | * | * | |
| MT3Cob | ctccaaagggt | aggacaccct | gagacccgta | aagctattcg | ccgtgccttt |
| MT3Hum | ctccaaaagt | aggagaccct | gagactcgta | aagctattcg | ccgtgccttt |
| | * | * | * | | |
| MT3Cob | gatgtgtggc | agaatgtaac | tcctctgaca | tttgaagaag | ttccctacag |
| MT3Hum | gatgtgtggc | agaatgtaac | tcctctgaca | tttgaagaag | ttccctacag |
| MT3Cob | tgaattagaa | aatggcaaac | gtgatgtgga | tataaccatt | atTTTTgcat |
| MT3Hum | tgaattagaa | aatggcaaac | gtgatgtgga | tataccatt | atTTTTgcat |
| | | | | * | |
| MT3Cob | ctggcttcca | cggagacagt | actccctttg | atggggaggg | aggatttttc |
| MT3Hum | ctggtttcca | tggggacagt | tctccctttg | atggagaggg | aggatttttg |
| | * | * * | * | * | * |
| MT3Cob | gcacatgcct | atTTNccctg | gaccaggaan | cggaggggac | atgcatttttg |
| MT3Hum | gcacatgcct | acttNccctg | gaccaggaat | tggagagat | accatttttg |
| | | * | | * * * | ** |

Fig.5 Secuencia de nucleótidos obtenida por RT-PCR comparándola con la MT3-MMP humana. Existe un alto porcentaje de homología. La secuencia humana corresponde a la región desde el nucleótido 433 al 780 de la descrita por Takino y cols. (9).

Cuando la secuencia de aminoácidos deducida para el producto génico de MT3Cob se alineó con la secuencia de aminoácidos para la MT3-MMP humana se observó una identidad de 93.91%. (figura 6).

Además se comparó con las secuencias reportadas para las otras MT-MMPs humanas (MT1, MT2 y MT4-MMP) como se observa en la figura 7. Es



Fig. 2. Se muestra la calidad del RNA total extraído. Las bandas que sobresalen corresponden a los rRNA 28 y 18s. Carril 1, ladder; carril 2, RNA control; carril 3, RNA PMA.

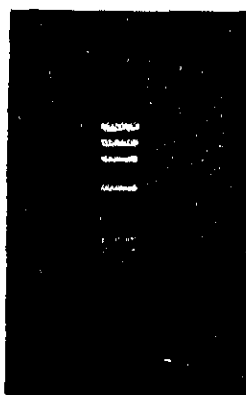


Fig.3. Expresión de la MT3Cob en células JH4 de pulmón de cobayo. Se obtuvo un producto de tamaño semejante al esperado (377 pb.) tanto en el control como en la muestra estimulada. En las muestras tratadas con PMA se observa mayor concentración. Carriles 1 y 5, control, carriles 2 y 4, PMA; carril 3, ϕ x-174.

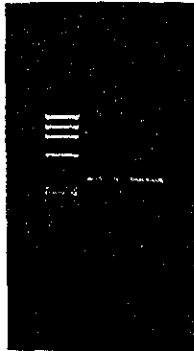


Fig. 4. Productos amplificados con menor cantidad de cDNA (5 μ l); el barrido disminuyó considerablemente. Carril 1: ϕ x-174; carril 2: control; carril 3: PMA.

importante señalar que el fragmento que se obtuvo en este trabajo, contiene dos de los tres insertos característicos de las MT-MMPs. Dichos sitios son el inserto 1 (SI-1) y el inserto 2 (SI-2). La identidad con las MT-MMPs para la región obtenida (extremo terminal del dominio propeptídico y extremo inicial del dominio catalítico) también es muy alta.

Por último, se hizo la revisión de la secuencia de aminoácidos obtenida (MT3Cob) con otras MT3-MMPs clonadas en *Gallus gallus*, y *Rattus rattus* respectivamente. En este caso, la identidad fue del 94.04%, lo que indica que la enzima se encuentra muy conservada, por lo menos entre estos organismos (Fig. 8).

MT3Cob ArgGlySerSerLysPheAsnValArgArgLysArgTyrAlaLeuThrGlyGln
MT3Hum ArgGlySerSerLysPheHisIleArgArgLysArgTyrAlaLeuThrGlyGln
* *

MT3Cob LysTrpGlnHisLysHisIleThrTyrSerIleLysAsnValThrProLysVal
MT3Hum LysTrpGlnHisLysHisIleThrTyrSerIleLysAsnValThrProLysVal

MT3Cob GlyHisProGluThrArgLysAlaIleArgArgAlaPheAspValTrpGlnAsn
MT3Hum GlyAspProGluThrArgLysAlaIleArgArgAlaPheAspValTrpGlnAsn
*

MT3Cob ValThrProLeuThrPheGluGluValProTyrSerGluLeuGluAsnGlyLys
MT3Hum ValThrProLeuThrPheGluGluValProTyrSerGluLeuGluAsnGlyLys

MT3Cob ArgAspValAspIleThrIleIlePheAlaSerGlyPheHisGlyAspSerThr
MT3Hum ArgAspValAspIleProIleIlePheAlaSerGlyPheHisGlyAspSerSer
* *

MT3Cob ProPheAspGlyGluGlyGlyPhePheAlaHisAlaTyrPheProGlyProGly
MT3Hum ProPheAspGlyGluGlyGlyPheLeuAlaHisAlaTyrPheProGlyProGly
*

MT3Cob IleGlyGlyAspMetHisPhe
MT3Hum IleGlyGlyAspThrHisPhe
*

Fig.6 Secuencia de aminoácidos deducida de la posible MT3 de cobayo comparada con la MT3 humana. Notese el alto porcentaje de identidad entre ambas.

```

MT1Hum GAËIKANVRRKRYAIOGLKWQHNEITFCIQNYTPK--VGEYATYEAIRKAFRVW
MT2Hum --KALNRRRRKRYALTGRKWNHHLTFSIQNYTEK--LGWYHSMEAVRRAPRVW
MT3Hum RGSSKFHIRRKRYALTGQKWQHKHITYSIKNVTPK--VGDPETRKAIIRRAFDVW
MT3Cob RGSSKFNVRRKRYALTGQKWQHKHITYSIKNVTPK--VGHPETRKAIIRRAFDVW
MT4Hum --PVLTAQARRRRQAPAPTKWNRNLSWRVRTFPDRSPLGHDTVRALMYALKVW

```

```

      **.* *      ** . . . . . * . . . * . **
      { SI-1 }

```

```

MT1Hum ESATPLRFREVPYAYIREGHEKQADIMIFFAEGFPHGDSTPFDDGEGGFLAHAYFP
MT2Hum EQATPLVFQEVFYEDIRLRRQKEADIMVLFASGFHGDSSPFDGTGGFLAHAYFP
MT3Hum QNVTPPLTFEEVPYSELENGK-RDVDIPIIFASGFHGDSSPFDGEGGFLAHAYFP
MT3Cob QNVTPPLTFEEVPYSELENGK-RDVDITIIIFASGFHGDSTPFDDGEGGFFAHAYFP
MT4Hum SDIAPLNFHEVA-----GSTADIQIDFSKADHNDGYPFDDARRH-RAHAFFP

```

```

      .** * ** .      ** * * . . * * . ***      *** . **
      { SI-2 }

```

```

MT1Hum GPN-IGGDTHF
MT2Hum GPG-LGGDTHF
MT3Hum GPG-IGGDTHF
MT3Cob GPG-IGGDMHF
MT4Hum GHHHTAGYTHF
      *      . * ***

```

Fig.7 Comparación de las metaloproteinasas asociadas a membrana de humano, con la MT3Cob, por alineación de secuencias de aminoácidos. Dichas secuencias forman parte del extremo terminal del dominio propeptídico y el extremo inicial del dominio catalítico. Los asteriscos representan identidad y los puntos homología. Se muestran además los sitios de inserción 1 y 2.

```

MT3Cob RGSSKFNVRRKRYALTGQKWQHKHITYSIKNVTPKVGHPETRAIRRAFDVWQN
MT3Gal RGSSKFNIRRKRYALTGQKWQHKHIAYSIKNVTPKVGDAETRAIRRAFDVWQN
MT3Rat RGSSKFNIRRKRYALTGQKWQHKHITYSIKNVTPKVGDPETRAIRRAFDVWQN

```

```

      *      **      *      **      *

```

```

MT3Cob VTPLTFEEVPYSELENGKRDVDITIIIFASGFHGDSTPFDDGEGGFFAHAYFFPGPG
MT3Gal VTPLTFEEVPYIELENGKRDVDITIIIFASGFHGDSSPFDGEGGFLAHAYFFPGPG
MT3Rat VTPLTFEEVPYSELENGKRDVDITIIIFASGFHGDSPFDGEGGFLAHAYFFPGPG

```

```

      *      **

```

```

MT3Cob IGGDMHF
MT3Gal IGGDTHF
MT3Rat IGGDTHF

```

```

      *

```

Fig 8 Alineación de secuencias de aminoácidos de otras MT3-MMP clonadas en *Gallus gallus* (MT3Gal) y en *Rattus rattus* (MT3Rat), con la MT3Cob

Northern blot

Cuando se utilizó este producto de amplificación como sonda en un ensayo de Northern blot, a pesar de utilizar una concentración de 25 μg de RNA total por carril y de numerosas repeticiones no se observó ningún transcrito en las muestras de RNA de fibroblastos de cobayo (Figura 8). La membrana se hibridó con la sonda para el RNA ribosomal 18S para mostrar la presencia y control de carga de RNA en los diferentes carriles. En corazón, cerebro, ovario e intestino delgado se ha descrito un transcrito de 12Kb y uno de 7Kb (14).

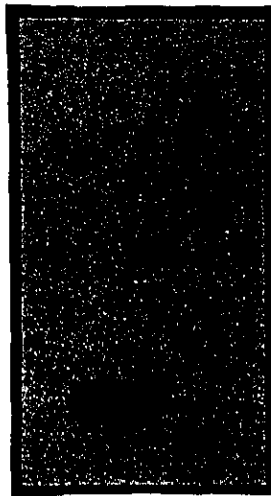


Fig. 9. Northern blot, realizado con 25 μg de RNA total y con el producto de PCR (MT3Cob) utilizado como sonda. No se detectó ninguna señal y la membrana se rehibridó con una sonda de rRNA 18s.

DISCUSION.

Las metaloproteinasas de matriz desempeñan un papel crítico en la remodelación tisular en varias condiciones fisiológicas y patológicas. En este trabajo se reporta por primera vez la expresión en fibroblastos de pulmón de cobayo (*Cavia porcellus*) de una metaloproteinasa de membrana identificada como la MT3-MMP.

La MT3-MMP en humanos se ha detectado fundamentalmente en tejido cerebral normal y en tumores astrocíticos aunque su nivel de expresión es menor comparado con la expresión de MT1-MMP y MT2-MMP en glioblastomas (17). Además se ha localizado la proteína inmunorreactiva en células de microglía en tejido cerebral de enfermedad de Alzheimer, tanto en la materia gris como en la blanca sugiriendo que MT3-MMP puede desempeñar un papel importante en este tipo de células (18).

En el presente trabajo encontramos que la expresión de un producto de 377 pares de bases que presenta alta homología con la MT3-MMP humana pudo ser revelada solo por RT-PCR y no por northern blot lo que nos hace suponer que el nivel de expresión de la enzima es muy bajo. Existen reportes que en fibroblastos de pulmón embrionario en humanos la MT3-MMP se expresa en muy bajos niveles (15).

Existen pocos estudios sobre los mecanismos de regulación de la expresión de la MT3-MMP. Es interesante señalar que nuestros resultados

preliminares sugieren que la expresión de MT3-MMP es aumentada por PMA. Datos de la literatura han mostrado que esta enzima se expresa en las células de músculo liso vascular de rata , particularmente en vasos sanguíneos en remodelación de arterias carótidas sometidas a cirugía por balón, sin que se pudiera detectar en células de músculo liso de tejido normal vascular . El nivel de expresión *in vitro* fue fuertemente aumentado por el factor de crecimiento derivado de plaquetas y por fibronectina (19).

Por otro lado como la expresión de la MT3-MMP de cobayo no fue detectada en ninguna de las membranas analizadas por Northern Blot, no se pudo conocer el tamaño del mRNA. Además como la amplificación que se hizo no consideraba el inserto del dominio transmembranal no podemos saber si la expresión de esta enzima en fibroblastos de pulmón de cobayo es como una enzima asociada a membrana, o como se ha reportado en otros casos, como una proteína soluble (15).

La identidad entre la metaloproteínasa de matriz asociada a membrana que en el presente trabajo se menciona como MT3Cob y el resto de las secuencias de aminoácidos reportadas (para humano, gallo y rata), resultó ser muy alta, lo cual sugiere que en el curso evolutivo esta enzima se mantiene muy conservada, y que además mantiene una estrecha relación con la MT1 y MT2-MMPs ya que al parecer, con la MT4-MMP posee menos similitud como se ha reportado en estudios previos (20).

Será importante continuar con otros estudios que nos permitan

REFERENCIAS.

- 1.- Pardo, A. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. *Rev Inst Nac Enf Res Méx* 6 (1993) 156-164.
- 2.- Birkedal-Hansen, A; Moore H. W.G.I; Bodden M.K; Windsor, L.J; Birkedal-Hansen, B; DeCarlo, A; Engler, J.A. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Oral Biol Med* 4 (1993) 197-250.
- 3.- Woessner, B. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N.Y. Acad Sci* 732 (1994) 11-21.
- 4.- Pardo, A; Selman, M. Matrix metalloproteinase and lung injury. *Braz J Med Biol Res* 29 (1996) 1109-1115.
- 5.- Bottomley, K.M; Johnson, W.H; Walter, D.S. Matrix metalloproteinase inhibitors in arthritis. *J Enzy Inhib* 13 (1998) 79-101.
- 6.- Murphy, G. en *AAS 35: Progress in inflammation research and therapy* 69, Verlag Birkhauser, Basel (1991).
- 7.- 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* 370 (1994) 61-65.
- 8.- Will, H; Hinzmann, B. cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential tranmembrane segment. *Eur J Biochem* 231 (1995) 602-608.
- 9.- 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. *J Biol Chem* 270 (1995) 23013-23020.
- 10.- Puente, X; Pendás, A; Llano, E; Velasco, G. and López-Otín, C. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* 56 (1996) 944-949.
- 11.- Sato, H.; Kinoshita, T.; Takino, T.; Nakayama, K.; Seiki, M. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2). *FEBS Lett* 393 (1996) 101-104.

- 12.- Cao, J; Rehemtulla, A; Bahou, W; Zucker, S. Membrane Type Matrix Metalloproteinase 1 activates pro-gelatinase A without Furin Cleavage of the N-terminal domain. 271 (1996) 30174-30180.
- 13.- Cao, J; Sato, H; Takino, T and Seiki, M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for Pro-gelatinase A activation. J Biol Chem 270 (1995) 801-805.
- 14.- Kinoshita, T; Sato, H; Takino, T; Itoh, M; Akizawa, T; Seiki, M. Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. Cancer Res 56 (1996) 2535-2538.
- 15.- Matsumoto, S; Katoh, M; Saito, S; Watanabe, T; Masuho, Y. Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA. Biochem Biophys Acta 1354 (1997) 159-170.
- 16.- Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acidic guanidiniumthiocyanate phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162 (1987) 156-159.
- 17.- Nakada M, Nakamura H, Ikeda E, Fujimoto N, Yamashita J, Sato H, Seiki M, Okada Y. Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. Am J Pathol 1999, 154:417-28
- 18.- Yoshiyama Y, Sato H, Seiki M, Shinagawa A, Takahashi M, Yamada T. Expression of the membrane-type 3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) in human brain tissues. Acta Neuropathol 1998 ;96:347-50
- 19.- Shofuda K, Nagashima Y, Kawahara K, Yasumitsu H, Miki K, Miyazaki K. Elevated expression of membrane-type 1 and 3 matrix metalloproteinases in rat vascular smooth muscle cells activated by arterial injury. Lab Invest 1998 Aug;78(8):915-23
- 20.- Massova, I; Kotra, L; Fridman, R and Mobashery, S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. FASEB J 1998 ; 12:1075-1095.
- 21.- Shofuda K, Yasumitsu H, Nishihashi A, Miki K, Miyazaki K. Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain. J Biol Chem 1997 Apr 11;272(15):9749-54
- 22.- Ausubel, F; Brent, R; Kingston, R; Moore, D; Seidman, J; Smith, J; Struhl, K. -editors- (1994-1997). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc USA.

- 23.- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, JD.(1994) Molecular Biology of the Cell. 3ed. Garland Publishing; New York.
- 24.- Amy Sang, Q; Douglas, D; Computacional sequence analysis of the matrix metalloproteinases. *J Prot Chem* 15 (1996) 137-159.
- 25.- Cossins, J; Dudgeon, T; Catlin, G; Gearing, A; Clements, J. Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 228 (1996) 494-498.
- 26.- D'Orto, M; Will, H; Atkinson, S; Butler, G; Messent, A; Gavrilovic, J; Smith, B; Timpl, R; Zardi, L. and Murphy, G. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 250 (1997) 751-757.
- 27.- D'Orto, M; Stanton, H; Butler, M; Atkinson, S; Murphy, G; Hembry, R. MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Letters* 421 (1998) 159-164.
- 28.- Faisal Khan, K. M; Falcone, D.J. Role of the laminin in the matrix induction of the macrophage urokinase-type plasminogen activator and 92-kDa metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 272 (1997) 8270-8275.
- 29.- Gilles, C; Polette, M; Piette, J; Munaut, C; Thompson, E. Birembaut, P. and Foidart, J. High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. *Int J Cancer* 65 (1996) 209-213.
- 30.- Harwood, J. (1996). Basic DNA and RNA protocols. Human Press; Totowa, New Jersey.
- 31.- Kitagawa Y, Kunimi K, Ito H, Sato H, Uchibayashi T, Okada Y, Seiki M, Namiki M. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human urothelial carcinomas. *J Urol* 1998 ;160:1540-5
- 32.- Lewin, B. (1994). Genes V. Oxford University Press Inc. New York, USA.
- 33.- Lohi, J; Lehti, K; Westermarck, J; Kahari, V and Keski-Oja, J. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression by growth factors and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Eur J Biochem* 239 (1996) 239-247.
- 34.- Mullis, K; Ferré, F; Gibbs, R. -editors- (1994). The polymerase chain reaction. Birkhauser; Boston, USA.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 35.- Okada, A; Bellocq, J; Rouyer, N; Chenard, M; Rio, M; Chambon, P; Basset, P. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (1995) 2730-2734.
- 36.- Ramírez, R. Expresión y producción de colagenasas tipo IV por fibroblastos de pulmón normal y con fibrosis idiopática.(1998). Tesis Maestría en Ciencias; Facultad de Ciencias. UNAM.
- 37.- Saiki, R; Gelfand, D; Stoffel, S; Scharf, S; Higuchi, R; Horn, G; Mullis, K; Erlich, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1988) 487-491.
- 38.- Salo, T; Turpeenniemi-Hujanen, T. and Tryggvason, K. Tumor-promoting phorbol esters and cell proliferation stimulate secretion of basement membrane (type IV) collagen-degrading metalloproteinase by human fibroblasts. *J Biol Chem* 260 (1985) 8526-8531.
- 39.- Sambrook. J; Fritsch, E.F; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- 40.- Signe F.B; Hastrup, N. Lund, L.R; Dano, K; Larsen J.F; Pyke, C. Co-ordinated expression of MMP-2 and its a putative activator, MT1-MMP, in human placentation. *Mol Hum Repr* 3 (1997) 713-723.

Al término de este trabajo, se describió la clonación de un nuevo miembro de la familia de las metaloproteinasas (MT5-MMP):

Pei, D. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. (1999) J Biol Chem 274 (13): 8925-32.

Llano, E; Pendas, AM; Freije, JP; Nakano, A; Knauper, V; Murphy, G; Lopez-Otin, C. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. (1999) Cancer Res 59 (11): 2570-6.