

00381

37



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS  
SUBPOBLACIONES DE FIBROBLASTOS EN  
PULMÓN HUMANO NORMAL Y CON  
FIBROSIS PULMONAR DIFUSA  
(FPD)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A**

**M. en C. CARLOS RAMOS ABRAHAM**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. ANNIE PARDO SEMO**

2061



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.

# CONTENIDO

|  | Página |
|--|--------|
| <b>CONTENIDO</b> _____   | i      |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> _____   | ii     |
| <b>RESUMEN</b> _____   | iii    |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> _____  | 1      |
| fibrosis pulmonar _____  | 1      |
| matriz extracelular _____  | 4      |
| Metaloproteinasas de matriz extracelular _____   | 7      |
| Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas _____   | 10     |
| Muerte celular por apoptosis _____   | 12     |
| Los fibroblastos: consideraciones generales _____  | 16     |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> _____   | 19     |
| <b>OBJETIVOS GENERALES</b> _____   | 20     |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> _____   | 20     |
| <b>PACIENTES Y MÉTODOS</b> _____   | 21     |
| Aislamiento y cultivo de fibroblastos _____  | 21     |
| Ensayo de la tasa de crecimiento _____   | 22     |
| Análisis citofluorométrico de apoptosis y $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -AML) _____    | 24     |
| Ensayo de apoptosis espontánea por citometría de flujo _____   | 25     |
| Análisis de $\alpha$ -actina de músculo liso por Citometría de Flujo _____                           | 26     |
| Microscopía y Análisis de imágenes de $\alpha$ -actina de músculo liso _____                         | 26     |
| Microscopía de fluorescencia para apoptosis _____  | 27     |
| Extracción del RNA total _____   | 27     |
| Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa _____                                    | 29     |
| PCR competitivo _____  | 31     |
| Ensayo de Biosíntesis de colágena _____  | 30     |
| Cuantificación de TGF- $\beta$ 1 _____   | 34     |
| Análisis estadístico _____   | 34     |
| <b>RESULTADOS</b> _____  | 35     |
| Análisis de la tasa de crecimiento _____   | 35     |
| Análisis del % de apoptosis y de $\alpha$ -actina de músculo liso<br>mediante citofluorometría _____ | 35     |
| Análisis de $\alpha$ -actina de músculo liso mediante citometría de flujo _____                      | 36     |
| Expresión genica en fibroblastos derivados de FPI y controles _____                                  | 37     |
| <b>DISCUSIÓN</b> _____   | 48     |
| <b>CONCLUSIONES</b> _____  | 56     |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> _____  | 57     |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                  |   |
|------------------|---|
| FBS              | del ingles Fetal bovine serum: suero fetal bovino   |
| EM               | del ingles extracellular matrix: matriz extracelular  |
| MMP              | del ingles matrix metalloproteinase: metaloproteinasas de matriz extracelular   |
| MT-MMP           | del ingles membrane type-matrix metalloproteinase: metaloproteinasas de matriz extracelular asociada a la membrana plasmática   |
| CIC              | Célula intersticial contráctil  |
| TUNEL            | del ingles Terminal deoxynucleotide transferase (TdT)- mediated dUTP-digoxigenin Nick-End Labeling; marcaje de los extremos del DNA fragmentado mediante la enzima TdT con dUTP-digoxigenina. |
| DPF              | del ingles diffuse pulmonary fibrosis: fibrosis pulmonar difusa   |
| IPF              | del ingles idiopathic pulmonary fibrosis: fibrosis pulmonar idiopática  |
| UIP              | del ingles usual interstitial pneumonia: neumonía intersticial usual  |
| mRNA             | del ingles messenger ribonucleic acid: ácido ribonucleico mensajero   |
| DNA              | del ingles desoxyribonucleic acid: ácido desoxiribonucleico   |
| cDNA             | del ingles complementary desoxyribonucleic acid: ácido desoxiribonucleico complementario  |
| EDTA             | del ingles ethylen diamine tetra-acetic acid: ácido etileno diamino tetraacético  |
| TIMP             | del ingles tissue inhibitor of metalloproteinase; inhibidor tisular de metaloproteinasas  |
| TGF $\beta$ 1    | del ingles transforming growth factor- $\beta$ 1: factor transformante de crecimiento $\beta$ tipo 1  |
| TGF- $\alpha$    | del ingles transforming growth factor- $\alpha$ : factor transformante de crecimiento tipo $\alpha$   |
| IL-1 y IL-4      | interleukin types 1 and: 4 Interleucinas tipos 1 y 4  |
| TNF- $\alpha$    | del ingles tumoral necrosis factor type $\alpha$ : factor de necrosis tumoral $\alpha$  |
| EGF              | del ingles epidermoid growth factor: factor de crecimiento epidermoide  |
| FGF              | del ingles fibroblast growth factor: factor de crecimiento para fibroblastos  |
| PDGF             | del ingles platelet derived growth factor: factor de crecimiento derivado de plaquetas  |
| ISEL             | del ingles <i>in situ</i> end labeling (of terminal extremes in fragmented DNA): marcaje <i>in situ</i> de los extremos del DNA fragmentado   |
| FALS             | del ingles Forward Angle Light Scatter  |
| PMSF             | del ingles: Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride; fenil metil sulfonyl fluoruro  |
| NEM              | del ingles N-ethyl maleimide: N-etil-maleimida  |
| NaN <sub>3</sub> | azida de sodio  |
| $\alpha$ -SMA    | del ingles $\alpha$ -smooth muscle actin: $\alpha$ -actina de músculo liso  |
| PI               | del ingles Propidium Iodide: Yoduro de Propidio   |
| RT-PCR           | del ingles retrotranscription-polymerase chain reaction: retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa   |
| DR               | del ingles death receptor; receptor para muerte celular   |
| DD               | del ingles death domain; dominio para muerte celular  |
| DISC             | del ingles death-inducing signaling complex; complejo de señalización para la inducción de muerte celular   |
| FADD             | del ingles Fas-Associated Death Domain (ó Mort-1); dominio para muerte celular asociado al receptor de Fas  |
| GAPDH            | del ingles glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  |
| cGAPDH           | del ingles complementary GAPDH: GAPDH complementario  |

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN.** La fibrosis pulmonar idiopática/neumonía intersticial usual (IPF/UIP), es un desorden pulmonar progresivo, generalmente letal que se caracteriza por la proliferación de fibroblastos y acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular (EM), especialmente de las colágenas fibrilares. Una característica considerada de importancia fundamental considerada recientemente en esta enfermedad, es la presencia de focos de fibroblastos ampliamente dispersos por todo el parénquima pulmonar, que parecen representar zonas microscópicas de daño pulmonar agudo, hacia donde éstas células migran y proliferan en un intento de reparar el daño alveolar preexistente; ocurriendo subsecuentemente el remodelamiento anormal de la arquitectura alveolar; dando como resultado el depósito de tejido conectivo intersticial e intraluminal característico de la IPF. Sin embargo, los estudios enfocados al análisis de las características proliferativas de los fibroblastos obtenidos de pulmón humano con IPF y normales son escasos y contradictorios. Así por ejemplo: mientras Jordana y cols. mostraron que los fibroblastos derivados de tejido fibrótico proliferan significativamente más rápido que los fibroblastos derivados de pulmón humano normal, Raghu y cols. encontraron que la proliferación de fibroblastos fue más alta en células derivadas de áreas con inflamación comparadas con los de áreas normales, mientras que el rango de proliferación más bajo fue observado en células obtenidas de áreas con fibrosis densa.

Por otra parte, los fibroblastos no son poblaciones homogéneas, de manera que en la década de los 90's, surgió el concepto de diversidad o heterogeneidad de los fibroblastos. El cual se refiere a la presencia de diferentes subpoblaciones de fibroblastos. De manera que hoy conocemos que la presencia de tales subpoblaciones corresponde a fibroblastos pulmonares fenotípicamente distintos, en los cuales se han descrito diferencias en los tipos

de marcadores de superficie, expresión de receptores membranales, arquitectura de citoesqueleto con filamentos característicos, y diferentes patrones de expresión de citosina y moléculas de la EM. En este contexto, hemos demostrado recientemente diferencias significativas en la tasa de crecimiento de subpoblaciones de fibroblastos pulmonares separadas por gradientes de ficol en condiciones atmosféricas estándar (1g), con una relación inversa entre el tamaño celular y la tasa de crecimiento.

Los miofibroblastos son subpoblaciones de fibroblastos que expresan características de células musculares lisas y de fibroblasto. Estas células positivas para  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), se incrementan en la IPF y constituyen el principal componente de los focos de fibroblastos. Además, estas células adquieren un fenotipo que favorece la acumulación de colágena. Por otra parte, el remodelamiento anormal de la matriz extracelular observado en la IPF es debido, al menos parcialmente, a un desbalance en la síntesis y secreción de algunos componentes de la familia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), por ejemplo la colagenasa-1 (MMP-1), las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9), y a los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs). Los fibroblastos son buenos candidatos para desempeñar una importante participación en este proceso fibrogénico, debido a que son responsables de la secreción exagerada de la mayoría de los componentes de la EM; sin embargo, su participación mediante la expresión de MMPs y TIMPs es conocida parcialmente.

**OBJETIVOS.** Se analizó la tasa de crecimiento, % de apoptosis espontánea, % de células positivas para  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), y expresión de los mRNA del factor transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ 1), colágena  $\alpha$ 1[I], colagenasa-1 (MMP-1), gelatinasas A y B y TIMP-1, -2, -3 y -4 en cultivos primarios de fibroblastos pulmonares derivados de pacientes con IPF (n=5), y sujetos control (n=5).

**MATERIAL Y MÉTODOS.** La tasa de crecimiento se analizó mediante un ensayo basado en la utilización del cromógeno WST-1 que es una sal derivada del formazán; el % de apoptosis espontánea, con la técnica del marcaje in situ de los extremos del DNA fragmentado (ISEL), combinado con la tinción de Yoduro de Propidio mediante citometría de flujo; el porcentaje de positividad para  $\alpha$ -SMA a través de citometría de flujo y microscopía fluorescente; y la evaluación de la expresión del mRNA del factor transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ 1), colágena  $\alpha$ 1[I], colagenasa-1, gelatinasas A y B, y TIMP-1, -2, -3 y -4 utilizando la metodología de la RT-PCR.

**RESULTADOS.** La tasa de crecimiento fue significativamente más baja en los fibroblastos de IPF comparada con los controles, tanto con 1 como con 10 % de FBS, y desde los 4 hasta los 13 días del análisis. De manera opuesta, fue observado un porcentaje significativamente más alto de células con apoptosis espontánea en los fibroblastos derivados de IPF ( $31.4 \pm 6.9$  vs.  $15.0 \pm 7.4$  en los controles;  $p < 0.008$ ). El análisis de las células positivas para  $\alpha$ -SMA (principalmente miofibroblastos) reveló un porcentaje significativamente mayor en las células derivadas de IPF ( $62.8 \pm 25.2$  vs.  $14.8 \pm 11.6$  % de los controles;  $p < 0.01$ ). Los fibroblastos derivados de IPF se caracterizaron por incremento en la expresión de colágena  $\alpha$ 1[I], TGF $\beta$ 1, gelatinasa B, y de todos los TIMPs; mientras que la expresión de colagenasa-1 y gelatinasa A no mostró diferencias.

**CONCLUSIÓN.** Estos resultados sugieren que en los cultivos primarios de fibroblastos obtenidas de pacientes con IPF, existe un fenotipo celular que favorece el desarrollo del proceso de fibrosis, con incremento en la síntesis de colágena I, así como incremento en la expresión colagenasa B, TGF $\beta$ 1, y los TIMPs 1, 2, 3, y 4; mostrando estas células además, tasa de crecimiento muy baja, mayor % de apoptosis espontánea, y alto % de células positivas para  $\alpha$ -actina de músculo liso (principalmente miofibroblastos).

# INTRODUCCIÓN.

## Fibrosis Pulmonar

La fibrosis pulmonar difusa (DPF) es el resultado final de un grupo numeroso y heterogéneo de padecimientos respiratorios tanto agudos como crónicos que han sido clasificados como neumopatías intersticiales difusas, ó bien como enfermedades fibrosantes del pulmón (1). Estas enfermedades tienen como resultado final el depósito excesivo de matriz extracelular (EM), mejor conocido como fibrosis y que comprende de manera difusa al intersticio pulmonar, espacios intraalveolares y en algunos casos compromete inclusive las vías aéreas periféricas (1). En varias de estas patologías se han identificado agentes etiológicos, físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, en otras las causas son desconocidas y en tales casos se denomina neumonía intersticial idiopática, siendo la más frecuente y agresiva de ellas, la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), también conocida como neumonía intersticial usual (UIP) (2).

La fibrosis pulmonar idiopática, se ha definido como un desorden pulmonar crónico, progresivo, y generalmente letal, que se caracteriza por la proliferación y acumulación exagerada de fibroblastos que forman focos ubicados en zonas subepiteliales; con acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular, y en especial de las colágenas fibrilares tipos I y III (2, 3).

Aún cuando se han desarrollado numerosos estudios con diferentes modelos animales y en muestras pulmonares derivadas del padecimiento en el humano, la secuencia de los eventos que se suceden durante la patogenia de la IPF/UIP no se conoce con precisión. A pesar de este hecho, se han considerado tradicionalmente para el estudio y entendimiento de los mecanismos patogénicos de la IPFI/UIP los siguientes cuatro eventos: Un



daño ó agresión inicial, seguido de un proceso inflamatorio, continuado por un proceso fibroproliferativo y finalmente el remodelamiento anormal del tejido conectivo, en el que se desarrolla el depósito exagerado de matriz extracelular (1, 3).

Una nueva hipótesis en torno a la patogenia de la IPF (2), considera que el proceso inflamatorio no es una condición *sine qua non* que antecede al desarrollo de la etapa fibroproliferativa. En este contexto, una característica considerada de importancia fundamental durante la patogenia de la IPF/UIP, es la presencia de focos de fibroblastos, ampliamente dispersos por todo el parénquima pulmonar (3). Estos focos de fibroblastos al parecer representan zonas microscópicas de daño pulmonar agudo, en donde los fibroblastos migran y proliferan en un intento de reparar el daño alveolar, lo que causa el remodelamiento anormal de la arquitectura alveolar provocando el depósito de tejido conjuntivo intersticial e intraluminal (3-5).

El proceso de acumulación de matriz extracelular involucra un desbalance en su metabolismo, siendo responsables de este proceso las mismas subpoblaciones de fibroblastos presentes en los focos extendidos por todo el parénquima pulmonar. En este sentido, es importante mencionar diversas observaciones obtenidas en nuestro laboratorio. Una de éstas es el incremento transitorio en la síntesis de colágena (3-7), con la disminución progresiva en los niveles de algunas metaloproteinasas (8), acompañado de un incremento en la relación molar TIMP/colagenasa intersticial-1, que se observó en fibroblastos derivados de pacientes con IPF en relación con los controles (9); y con la consecuente disminución en la actividad colagenolítica en estados avanzados de la enfermedad (7). La mayoría de estos estudios se han realizado por lo general con tejidos pulmonares, y de esta manera, la participación de las diferentes subpoblaciones de fibroblastos no ha sido establecida con precisión en esta enfermedad.

Recientemente han sido publicados diversos estudios en los que se ha sugerido, que una de las subpoblaciones de fibroblastos que desempeñan un papel crucial en el proceso patogénico de la fibrosis es la de miofibroblastos; células probablemente diferenciadas de fibroblastos ó de células musculares lisas; éstas son células con capacidad contráctil y potente efecto fibrogénico. En el proceso de curación de heridas, estas células desempeñan un papel relevante en la fibrogénesis y finalmente desaparecen por apoptosis (5,10 -14).

Observaciones recientes tanto *in vivo* como *in vitro*, en el análisis de la proporción de miofibroblastos y la presencia de apoptosis en fibroblastos pulmonares, sugieren que es probable que este fenómeno también ocurra en la IPF (2). Además, se ha observado en la fibrosis producida experimentalmente en ratas, que la proliferación de fibroblastos derivados de pulmones con IPF es considerablemente más baja que la de los normales (13, 14). Un proceso similar ha sido descrito en la patogenia de la fibrosis renal y la cirrosis hepática (15).

En el caso de la cirrosis hepática, se ha propuesto que el pericito hepático se diferencia en miofibroblasto y es responsable de la fibrogénesis, para después morir por apoptosis en su estadio terminal de diferenciación, lo cual coincide con la etapa terminal del proceso fibrogénico (15). En este contexto, resulta importante entender los mecanismos mediante los cuales las poblaciones de fibroblastos y miofibroblastos mantienen la celularidad durante la patogenia de la IPF/UIP.

Es importante enfatizar que tradicionalmente se ha considerado en la patogenia de las enfermedades fibrosantes del pulmón, que la zona de acumulación excesiva y anormal de matriz extracelular se restringía al intersticio, por lo que se popularizó el término de fibrosis pulmonar intersticial. Sin embargo, en los años 90 se modificó este concepto, debido

a que en algunos estudios retrospectivos se analizaron los tejidos pulmonares de pacientes con diferentes tipos de fibrosis, incluyendo la IPF. En estos estudios se encontró que además de la fibrosis intersticial, existía depósito excesivo de matriz extracelular en los espacios adyacentes a zonas los epitelios alveolares dañados, que comprometían a las membranas basales, y contenían además cúmulos de fibroblasto y miofibroblastos. A esta forma de fibrosis se le denominó fibrosis intraluminal o intraalveolar (16,17). Por lo tanto, la IPF consiste de un componente de fibrosis intersticial asociada con otro de fibrosis intraluminal, ambos asociados a la presencia de focos de miofibroblastos y fibroblastos, en la cercanía inmediata a estas zonas con epitelio alveolar dañado, y en algunos casos desnudado, debido a la pérdida de las células epiteliales; los neumocitos tipo I y II principalmente (1, 3, 12).

## MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (EM) del pulmón, así como la de otros órganos se compone de dos categorías estructural y molecularmente distintas pero relacionadas entre sí: la EM intersticial y la EM de las membranas basales del epitelio alveolar y del endotelio-vascular, siendo estas últimas mejor conocidas como membranas basales. La EM intersticial se constituye por 75 % de colágenas fibrilares, 15 % de fibras elásticas, y el resto por diversas glicoproteínas. Todas estas moléculas embebidas dentro de un microambiente viscoelástico compuesto de proteoglicanos y glicosaminoglicanos (18), que son responsables de proporcionar una alta presión hidrostática interna a los tejidos, debido a la hidratación de los iones de sodio unidos a sus radicales sulfato (19). Adicionalmente, se encuentran diferentes poblaciones celulares de origen mesenquimatoso e

inmuno/inflamatorias, tales como fibroblastos, miofibroblastos, lipofibroblastos, células intersticiales contráctiles, pericitos, macrófagos, linfocitos T y B, y leucocitos polimorfonucleares (20-21).

La EM en las membranas basales se constituye principalmente de colágenas tipos IV y V, laminina, entactina, fibronectina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos como el heparán sulfato y el condroitín sulfato. En las unidades de intercambio gaseoso las membranas basales del epitelio alveolar y el endotelio vascular se fusionan y adelgazan facilitando así el intercambio de oxígeno y CO<sub>2</sub> (20-21).

Las colágenas constituyen una familia heterogénea de proteínas estructurales, formada de 19 tipos diferentes genéticamente, derivados de por lo menos 34 genes (22). Las moléculas de éstas proteínas se constituyen por la asociación de tres cadenas polipeptídicas denominadas  $\alpha$ , que se contienen por dominios colagénicos o triple helicoidales y dominios no colagénicos o no helicoidales. En los dominios colagénicos o triple helicoidales, existe una secuencia repetitiva de aminoácidos [-gly-Xaa-Yaa-]<sub>n</sub>, en donde la glicina se ubica cada tercer sitio y representa por lo tanto alrededor del 33% de los residuos de aminoácidos totales. Alrededor del 10-12 % de los residuos totales en la posición Xaa son ocupadas por prolina, y otro % igual por 4-OHprolina en la posición Yaa. También están presentes otros aminoácidos como la 3-OHprolina, lisina y 5-OHlisina pero en menor proporción. El arreglo repetitivo del tripéptido [-gly-Xaa-Yaa-]<sub>n</sub> permite la formación de la triple hélice asemejándose a una varilla cilíndrica rígida; el radical hidroxilo de la Ohprolina es esencial para la formación de puentes de Hidrógeno con el agua, lo cual estabiliza la triple hélice. Por otra parte la lisina e Ohlisina, tanto en áreas triple helicoidales como no helicoidales, permiten la formación de enlaces covalentes intermoleculares, lo cual es necesario para el ensamblaje supramolecular de las colágenas; además,

tanto la relación Orlisina/lisina, como el grado de hidroxilación de lisina se modifican para un mismo tipo de colágena en diferentes tejidos, y también varían con la edad del tejido (22).

Las colágenas se clasifican en dos grandes grupos: a) *colágenas fibrilares* que incluye los tipos I, II, III, V, y XI; y b) *colágenas no fibrilares*, las que a su vez se subdividen en varias categorías, y entre las que destacan aquellas que determinan estructuras reticulares en membranas basales como los tipos IV, VIII, y X. Además, se encuentran las colágenas asociadas a fibras: tipos IX, XII, XIV, XVI, y XIX. Por otra parte existen colágenas como los tipos XIII, y XV-XIX que fueron descubiertas por secuenciación del cDNA; éstas se expresan en varios tejidos y a excepción de la colágena XIX han sido ya caracterizadas (22-25).

Las moléculas de colágena dependiendo del tipo de cadenas  $\alpha$  que las constituyen, se pueden organizar como homotrímeros de 3 cadenas  $\alpha_1$  idénticas, como en las colágenas tipo II y III, o bien se pueden encontrar como heterotrímeros compuestos por una asociación de cadenas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  ó  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ; por ejemplo la colágena tipo I se compone por dos cadenas idénticas  $\alpha_1$ [I] y una cadena  $\alpha_2$ [I]; y en la colágena tipo VI se puede encontrar la combinación  $\alpha_1$ [VI] $\alpha_2$ [VI] $\alpha_3$ [VI]. En la colágena tipo IV se dispone de seis cadenas  $\alpha$ , de la  $\alpha_1$ [IV] a la  $\alpha_6$  [IV], sin embargo, la asociación más común la forman dos cadenas  $\alpha_1$ [IV] y una cadena  $\alpha_2$ [IV] (23-25).

Las colágenas representan del 15 al 20 % del peso seco del pulmón y entre sus funciones está la de mantener las fuerzas ténsiles y evitar el colapso de las unidades alveolo-capilares durante el ciclo respiratorio. Las colágenas fibrilares tipo I y III son las más abundantes, coexistiendo con los tipos V y VI. Por su parte, la colágena de membrana basal tipo IV representa el 5% de la masa total de las colágenas pulmonares (25,26).

Las células responsables de la síntesis de moléculas de matriz extracelular en el pulmón son principalmente los fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas, pericitos, células endoteliales, neumocitos tipo II y células mesoteliolebrales (25,26).

## METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular o MMP contienen  $Zn^{2+}$  en su sitio activo y requieren de  $Ca^{2+}$  para su actividad biológica. Estas metaloenzimas constituyen una familia de más de 20 proteínas que en conjunto pueden degradar todos los componentes de la matriz extracelular (27,28). Estas metaloproteinasas poseen especificidad, de tal manera que cada MMP tiene la propiedad de degradar un grupo particular de moléculas de la matriz extracelular.

Los diferentes miembros de la familia de la MMPs son el producto de diferentes genes, y comparten los siguientes dominios estructurales: (27,28-30):

- Un propéptido que codifica para un péptido señal que dirige a la proteína recién sintetizada hacia la cisterna del retículo endoplásmico, y por lo tanto hacia la vía de secreción.
- Un péptido de 8 -10 kDa que mantiene a la proteinasa inactiva, para lo cual se ha sugerido un mecanismo de “switch” que involucra la acción coordinada del residuo  $cys^{73}$  con el dominio catalítico. La activación de la proenzima requiere la remoción de este fragmento (31).
- Un *dominio catalítico* con la secuencia conservada -his-glu-x-gli-his- que incluye un *dominio de unión al Zinc*. Se reconocen dos sitios de unión al  $Zn^{2+}$ : en el primero ó “ $Zn^{2+}$  estructural” interactúa con los residuos de his 149,154 y 179; en el segundo ó “ $Zn^{2+}$  catalítico”, interactúa con los

residuos de las his 199, 203 y 210. En este último se lleva a cabo la actividad proteolítica para los diferentes sustratos.

- Un *dominio carboxi-terminal*. Con excepción de la MMP-7 y MMP-26 (matrilisina-1 y matrilisina-2) (32), el resto presentan un dominio carboxi-terminal con 3 ó 4 secuencias repetidas similares a la hemopexina/vitronectina, conectadas por un puente disulfuro entre los residuos cys<sup>259</sup> y cys<sup>466</sup>, que contribuye a la unión con el sustrato y los inhibidores (28,31).
- Existen otros dominios estructurales que comparten algunas de estas enzimas, por ejemplo: a) el dominio tipo furina, que es un sitio que permite la activación intracelular alternativa mediante la hidrólisis de un enlace peptídico. Algunas enzimas como las metaloproteinasas de membrana contienen este dominio; b) el dominio de anclaje transmembranal que también presenta el subgrupo de MMPs de membrana; c) dominios de reconocimiento de sustrato contenidos en el subgrupo de las gelatinasas, como por ejemplo un dominio tipo fibronectina que separa al dominio catalítico y un dominio similar a la colágena tipo V que presenta solo la gelatinasa B (33).

De acuerdo con las características funcionales y estructurales las MMPs se han clasificado en 6 diferentes subfamilias de miembros muy relacionados (28,29,31,32,34). Estas subfamilias son las siguientes:

**Colagenasas:** Este subgrupo reúne a 3 distintos miembros: la colagenasa-1 (MMP-1) expresada en un gran número de células, preferentemente fibroblastos y macrófagos, la colagenasa-2 de neutrofilos (MMP-8), y la colagenasa-3 (MMP-13) derivada de carcinoma de mama. Estas enzimas degradan preferentemente colágenas intersticiales tipos I, II, y III.

**Gelatinasas:** son la gelatinasa A ó colagenasa tipo IV de 72 kDa (MMP-2), y la gelatinasa B de 92 kDa (MMP-9) que degradan predominantemente colágena tipo IV y V, elastina y gelatina (colágena desnaturalizada).

**Estromelisinias:** son las estromelisinias 1 y 2 (MMP-3 y MMP-10). Estas enzimas actúan sobre todo sobre fibronectina, laminina, y colágena tipo IV.

**Matrilisinias:** Este subgrupo reúne a proteasas que contienen solo los tres dominios necesarios para la secreción, latencia y actividad catalítica. Está representado por la matrilisina (MMP-7) y la recién clonada matrilisina-2 (MMP-26).

**MMP tipo membrana (MT-MMP):** Estas proteínas tienen un dominio de membrana, una pequeña cola citoplásmica, y adicionalmente tienen un dominio de furina. Comprende 6 miembros diferentes, la MT1-MMP (MMP-14), MT2- MMP (MMP-15), MT3-MP (MMP-16) y MT4- MMP (MMP-17), MT5- MMP (MMP-24), y MT6- MMP (MMP-25) Son capaces de activar a otras MMPs como la MMP-2 y MMP-13. Estas metaloenzimas pueden degradar numerosas proteínas de la matriz extracelular.

**Otras MMPs:** Reúne a un grupo de enzimas cuyas propiedades estructurales o funcionales no les permite clasificarse en los subgrupos mencionados con anterioridad como por ejemplo la metaloelastasa de macrófagos (MMP-12), la estromelisina-3 (MMP-11), y la MMP-19.

La regulación de las MMPs ocurre a diferentes niveles (29,31,34). El primero de estos es transcripcional. Diferentes moléculas actúan como inductores de la activación de algunos de estos genes, entre éstos se encuentran IL-1, IL-4, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , EGF, FGF, PDGF, TGF- $\beta$ , interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , colchicina, pentoxifilina y concanavalina A. Por otra parte, entre las



moléculas que pueden reprimir algunos genes de las MMPs se encuentran los estrógenos y la progesterona.

Se ha propuesto que en los fibroblastos existe un factor específico que es inducido por EGF, que regula la estabilidad del mRNA de la colagenasa-1 y la estromelina 1; por otro lado, el TGF- $\beta$ 1 puede incrementar la estabilidad de mRNA de la MMP-2 (29,30).

Al nivel de secreción y activación, las MMPs se regulan mediante su péptido de 8-10 KDa, a través del "switch de cisteína". En algunos casos como en las procollagenasas de fibroblastos, neutrófilos y las proestromelinas 1 y 2, los propéptidos presentan sitios de hidrólisis enzimática para plasmina y tripsina; esta hidrólisis desestabiliza la interacción entre el residuo de cys<sup>73</sup> y el Zn<sup>2+</sup> y la conformación de la proteínasa cambia, permitiendo así el proceso autocatalítico hacia la forma activa. En el caso de la progelatinasa A (MMP-2), la activación se lleva a cabo en la superficie celular y las metaloproteinasas de membrana desempeñan un papel central mediante un complejo mecanismo que involucra a la MT1-MMP, y al TIMP-2.

Finalmente, la actividad de las MMPs puede ser modulada a través de su interacción con sus inhibidores tisulares específicos, conocidos como TIMPs, los cuales se unen a las MMPs en el sitio de unión al Zinc. Sin embargo, en el caso de las proenzimas de las gelatinasas MMP-2 Y MMP-9 existen sitios característicos de unión a los TIMPs; de manera que los TIMPs participan en los procesos de activación de estas MMPs.

## INHIBIDORES TISULARES DE LAS METALOPROTEINASAS

Los principales inhibidores de las metaloproteinasas, son los denominados TIMPs, de los que se conocen cuatro tipos: TIMP-1, TIMP-2,

TIMP-3 y TIMP-4, estos han sido identificados, caracterizados y clonados en varias especies de animales (29, 30, 35, 36). Los TIMPs se expresan en una amplia variedad de células, y se encuentran presentes tanto en el intersticio como en diversos fluidos corporales (37).

De estos inhibidores los mejor estudiados son los tipos 1, 2 y 3. Su peso molecular varía en función de que estén ó no glicosilados, así como del grado de glicosilación; para las proteínas no glicosiladas el PM se encuentra en el rango 21,000 a 28,500, aumentando en la forma glicosilada. Por ejemplo, en el caso del TIMP-1 el peso molecular de la proteína no glicosilada es de 21,000 y de 28,500 en su forma glicosilada. El TIMP-1 y el TIMP-2 son secretados por varias células y se encuentran en fluidos corporales y en zonas intersticiales, mientras que el TIMP-3 es el único que se encuentra exclusivamente asociado con moléculas de la matriz extracelular, y por lo tanto en forma insoluble.

Las moléculas de estos inhibidores se constituyen de 184-194 residuos de aminoácidos y presentan alrededor del 40% de similitud en su estructura primaria. La proteína consta de un péptido en el que la presencia de 12 residuos de cys altamente conservados e la evolución, que permiten la formación de seis enlaces disulfuro, esenciales para mantener la estructura terciaria de la molécula, además de que permiten la formación de asas o "loops". El dominio amino-terminal es necesario para la actividad inhibitoria de las MMPs. Sin embargo, para la gelatinasa A (MMP-2) las interacciones iónicas del dominio carboxi-terminal, son también importantes en la formación del complejo inhibitorio (29,35,36).

Los TIMPs además de inhibir las formas activas de las MMPs, desarrollan una serie muy amplia de funciones, algunas de éstas semejante a las de los factores de crecimiento. Estas funciones se han descrito para los TIMPs -1, -2 y -3 (35,36). Recientemente, se reportó el efecto

estimulador de la inhibición de apoptosis por TIMP-1 y TIMP-2 sobre linfocitos B, células epiteliales de glándula mamaria, y células de músculo liso cultivadas sobre diferentes biomatrices elaboradas a base de matrigel, colágena tipo I y fibronectina (38,39). También se ha evidenciado, el efecto inductor de apoptosis por el TIMP-3 en células epiteliales derivadas del carcinoma de colon y células de músculo liso cultivadas sobre matrigel (37,39).

## MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

Los principales mecanismos que mantienen la celularidad, los tipos y poblaciones celulares presentes en los tejidos son la proliferación, diferenciación y muerte celular; siendo la necrosis y la apoptosis los principales tipos de muerte celular. Las diferencias entre la necrosis y la apoptosis se encuentran indicadas en la tabla A y se citan a continuación:

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programado genéticamente, mientras que la necrosis no es programable (40, 41).

La necrosis es un mecanismo relacionado generalmente con procesos patológicos, mientras que la apoptosis se desarrolla fundamentalmente asociada a procesos fisiológicos, aunque también puede participar en el desarrollo de diferentes enfermedades; en la eliminación de células dañadas, disminución, y eliminación de cierta población especializada que el tejido ya no necesita (40), durante el recambio tisular, embriogénesis, remodelamiento, respuesta inmunológica y diferenciación entre otros procesos (40, 42,43).

La apoptosis se desarrolla en células individuales y dispersas más que en grupos celulares dentro del tejido; la célula en proceso de apoptosis disminuye de tamaño, el citoplasma se condensa conteniendo organelos

intactos, la cromatina nuclear se compacta y condensa formando zonas densas contiguas a la membrana nuclear, que se estructuran en forma de pequeñas vesículas de cromatina fragmentada, las cuales junto con las vesículas citoplásmicas, constituyen los cuerpos ó vesículas apoptóticas características. Finalmente, estas estructuras son fagocitadas por macrófagos y otras células fagocíticas vecinas (40-42). Además, la apoptosis se diferencia de la necrosis por ser un mecanismo dependiente del nivel y consumo de ATP intracelular.

Por otra parte, el mecanismo fisiológico opuesto a la apoptosis o cualquier otra forma de muerte celular es la proliferación celular. Ambos mecanismos son el resultado final de una serie compleja de eventos intracelulares que determinan finalmente el número de células tanto *in vitro* como *in vivo*. El término tasa de crecimiento se refiere a la velocidad de proliferación celular, y depende del balance entre muerte y duplicación celular (42).

La regulación del proceso de apoptosis es bastante compleja e involucra una trama molecular muy amplia, por lo que para su estudio se ha dividido en tres fases: la fase de inducción, la fase de efectores y la fase de hidrólisis enzimática o ejecución de la célula. La fase de inducción consiste en la transducción de las señales que estimulan el desarrollo del proceso de apoptosis, siendo una de ellas, la pérdida de contacto con la matriz extracelular. Por otra parte, se acompaña de señales intracelulares que atenúan la división celular arrojando a la célula en la fase G1 del ciclo celular (etapa Go)(43). Este efecto inductor es mediado por una serie amplia de estímulos, mejor conocidos como inductores de apoptosis, y se inicia cuando los receptores membranales para muerte celular o DR, se unen con ciertos factores de crecimiento o algún ligando proapoptótico específico. Los DR mejor estudiados son: el ligando de Fas (CD95 o Apo-1), TNF-R1 (p55 o

cd120a), DR3 (Apo3 o Wsl-1 o TRAMP o LARD), DR4, DR5 (Apo2 o TRAIL-R2 o TRICK-2 o KILLER) y p75NGF (44).

**Tabla A.** Características comparativas de la necrosis y la apoptosis. \*

| Característica                     | Necrosis   | Apoptosis  |
|------------------------------------|--|--|
| Distribución tisular               | grupos de células  | células independientes   |
| Reacción tisular                   | lisis y liberación del contenido celular                         | fagocitosis de cpos. Apoptóticos por células vecinas                   |
| Inducción de inflamación           | sí   | no   |
| Morfología celular                 | hinchazón  | encogimiento y pérdida de contacto Con células vecinas                 |
| Membrana plasmática                | pierde integridad  | forma vesículas apoptóticas<br>Aumenta de la permeabilidad             |
| Organelos                          | dañados  | intactos   |
| Núcleo                             | desintegrado   | condensado formando vesículas  |
| Lisosomas                          | con ruptura  | intactos   |
| Mitocondria alterada               | defectuosa, depleción de ATP<br>cambio en permeabilidad, ruptura | hinchazón, permeabilidad<br>liberación de citocromo C, posible ruptura |
| Cambios moleculares (bioquímicos): |  |  |
| DNA                                | degradación inespecífica   | hidrólisis internucleosomal  |
| Proteínas                          | degradación inespecífica   | activación de caspasas y calpainas                                     |
| Sustratos                          | sustratos inespecíficos  | sustratos específicos  |
| Moléculas anti-apoptosis           | Bcl-2 (a veces)  | familia de Bcl-2, IAPs, FLIPs, crmA<br>Inhibidores de caspasas         |
| Requerimiento de ATP               | no   | sí (indispensable)   |

\*Fuente: Granville DJ, Carthy CM, Hunt DWC, and McManus BM. Apoptosis molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Invest* 1998;78 (8)· 893-913

Estos receptores membranales, una vez que se han unido mediante su dominio extracelular al inductor específico (ligando o factor de crecimiento), por ejemplo Fas-L, TNF $\alpha$ , Apo 3L, forman complejos con las

proteínas llamadas adaptadoras, mediante secuencias de aminoácidos altamente conservadas en su evolución. Tales secuencias se denominan dominio para muerte o DD, y se encuentran ubicados en el extremo citoplásmico del receptor; con esta unión a los DD se forma el complejo de señalización inductor de muerte celular o DISC. Este complejo DISC recluta a un grupo de proteínas denominadas adaptadoras ó FADD las cuales se activan causando la dimerización y activación de la enzima procaspasa-8, para formar la caspasa-8 activa, la cual se encuentra íntimamente unida a los FADD (44,45).

De igual manera se activan la caspasas 10 y 9, aunque esta última enzima se activa dentro de una vía de inducción dependiente del citocromo C liberado por la mitocondria. Posteriormente, las caspasas 8, 9 y 10 activan a las procaspasas 3, 6 y 7 mediante mecanismos en cascada. Las caspasas son enzimas del grupo de las cisteín-proteinasas que participan en la fase de ejecución, en la que ocurre la fragmentación del DNA, proteínas nucleares como la lámina, la formación de las vesículas apoptóticas y todos aquellos fenómenos característicos de la etapa final del proceso de apoptosis, que ocurren antes de que la célula “desaparezca”, sin dejar finalmente ninguna evidencia de su muerte (40-45).

Existen diversas moléculas inductoras o inhibidoras de apoptosis, que han sido analizados bajo condiciones experimentales *in vivo* e *in vitro*. Entre los inductores se incluyen diversos activadores fisiológicos, factores de crecimiento, moléculas relacionados con daño y tensión (estrés) celular, toxinas e inhibidores de proteinasas como el TIMP-3, el ligando de Fas, el anticuerpo monoclonal anti-Fas, la familia del TNF ( $TNF\alpha$  y  $TNF\beta$ ) y los peptidos de angiotensina II (37, 45-47). Por su parte, los inhibidores de apoptosis agrupan varios inhibidores fisiológicos, diversos genes virales, e inhibidores de proteinasas como el TIMP-1 y TIMP-2, entre otros (37, 45).

## LOS FIBROBLASTOS: CONSIDERACIONES GENERALES

Como se anotó previamente, uno de los eventos claves en la patogenia de la IPF/UIP, es la proliferación exagerada de las subpoblaciones de fibroblastos, con la subsecuente acumulación anormal de matriz extracelular intersticial e intraluminal. De hecho, este proceso se asocia directamente con la irreversibilidad y letalidad de esta enfermedad en los pacientes, cuya esperanza de vida promedio no sobrepasa los 3 años a partir de la presencia de los síntomas característicos de la IPF, tales como la disnéa progresiva, hipoxemia, tos, sibilancias y la imagen radiográfica conocida como pulmón en panal de abeja (1-3).

Los fibroblastos forman parte del tejido conjuntivo pulmonar y participan de manera crucial en el mantenimiento de la función respiratoria. Entre las funciones que desarrollan estas células se encuentra la producción y remodelamiento de la matriz extracelular, la cual realizan mediante la síntesis de diversas moléculas como colágenas tipos I y III, fibras elásticas, proteoglicanos, y fibronectina, así como de una gran variedad de MMPs y TIMPs. Por otra parte, los fibroblastos interaccionan con diversas células locales, como las epiteliales e inflamatorias (macrófagos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares), a través de diferentes tipos de mensajes químicos como las quimosinas, neuropéptidos y factores de crecimiento (48,49-51).

Es importante considerar que actualmente el concepto de fibroblasto corresponde al de un grupo heterogéneo de células ó subpoblaciones denominadas genéricamente como fibroblastos. Entre estas subpoblaciones se incluyen los fibroblastos "clásicos", los pericitos, miofibroblastos, el lipofibroblastos, y células intersticiales contráctiles. Todas estas células, dependiendo de la composición molecular de su citoesqueleto, poseen mayor o menor capacidad contráctil y en el ámbito del parénquima

pulmonar, contribuyen a la distensibilidad característica de este órgano, así como a sus alteraciones en condiciones fisiopatológicas (48, 49, 50, 54, 55).

Una característica descrita recientemente, y considerada de importancia fundamental en la patogénesis de la FPI/UIP es la presencia de focos de fibroblastos/miofibroblastos, ampliamente dispersos por todo el parénquima pulmonar (4). En etapas tempranas, estos focos de fibroblastos antes parecen representar zonas microscópicas de daño pulmonar agudo, en donde los fibroblastos migran y proliferan en un intento de reparar el daño alveolar. Subsecuentemente ocurre el remodelamiento anormal de la arquitectura alveolar, que da como resultado del depósito excesivo y anormal de tejido conjuntivo intersticial e intra-alveolar (5).

Los estudios enfocados al análisis de las características proliferativas de los fibroblastos obtenidos de pulmón humano normal y de pulmones con IPF son escasos y contradictorios (10, 52, 53). Así por ejemplo, mientras Jordana y cols. (10) mostraron que los fibroblastos derivados de tejido fibrótico proliferan significativamente más rápido que los fibroblastos derivados de pulmón humano normal, Raghu y cols. (52) y encontraron que la proliferación de fibroblastos fue más alta en las células derivadas de áreas inflamadas comparada con las de áreas normales, mientras que el rango de proliferación más bajo fue observado en células obtenidas de áreas con fibrosis densa.

Por otra parte, los fibroblastos no son poblaciones homogéneas, y en la década de los 90's, surgió el concepto de diversidad o heterogeneidad de los fibroblastos, lo cual se refiere a la presencia de diferentes subpoblaciones de estas células mesenquimatosas. En este contexto, hoy conocemos que existen subpoblaciones de fibroblastos pulmonares fenotípicamente distintos, por ejemplo, en los tipos de marcadores de superficie, expresión de receptores, arquitectura y expresión de filamentos



del citoesqueleto, y expresión de moléculas de la matriz extracelular (13, 51). Así por ejemplo, recientemente se han demostrado diferencias significativas en la tasa de crecimiento de subpoblaciones de fibroblastos pulmonares humanos separados por gradientes de ficol en condiciones atmosféricas estándar (1g), con una relación inversa entre el tamaño celular y la tasa de crecimiento (13).

Los miofibroblastos son subpoblaciones de fibroblastos que expresan características tanto de células musculares lisas como de fibroblasto (54); expresan  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), constituyen el principal componente celular en los focos de fibroblastos en la IPF (4, 5), y parecen ser los principales responsables de la acumulación de colágena en esta enfermedad (55).

El remodelamiento anormal de la matriz extracelular (EM) observado en la IPF es debido, al menos parcialmente, a un desbalance entre algunos componentes de la familia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), por ejemplo la colagenasa-1 (MMP-1) y las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9), y a los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) (6-9,56,57).

Los fibroblastos pueden desempeñar un papel importante en este proceso aberrante, debido a que son responsables de la secreción de la mayoría de los componentes de la EM; sin embargo, su participación mediante la expresión de MMPs y TIMPs es prácticamente desconocida.

Un aspecto que no ha sido evaluado en cultivos primarios de fibroblastos pulmonares de pacientes con IPF y sujetos normales y que fue la base de esta tesis, es la relación existente entre la presencia de apoptosis, la positivas para  $\alpha$ -SMA, la tasa de crecimiento, y el análisis de la expresión génica de las metaloproteinasas (MMPs) y TIMPs.

## JUSTIFICACIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática, es una forma específica de neumonía intersticial e intraluminal fibrosante. Los pacientes que padecen esta enfermedad usualmente tienen entre 50 y 70 años de edad y dos tercios son mujeres. La estimación anual del número de casos es de 7 por cada 100,000 mujeres y de 10 por cada 100,000 hombres. la mayoría de los pacientes tienen síntomas 6 meses antes del diagnóstico de la enfermedad, y el tiempo que transcurre para el desarrollo de los síntomas graves de la enfermedad es de aproximadamente 24 meses; algunos de estos síntomas son la disnéa crónica progresiva, tos, dedos en forma de palillo de tambor, sibilancias, y finalmente una imagen radiográfica llamada “pulmón en panal de abeja”, que es la fase terminal cuando el proceso fibrogénico ha culminado y el pulmón está ya muy alterado morfo-funcionalmente. Cuando estos síntomas se presentan, la esperanza de vida de los pacientes es de aproximadamente tres meses.

Desafortunadamente, aunque se conocen estos y muchos otros aspectos de la enfermedad (1-3), no se cuenta con un tratamiento que permita la curación de los enfermos. Debido a esto, se debe seguir investigando para resolver este problema y obtener un tratamiento o prevención que evite el desarrollo de esta enfermedad. En relación con la participación de los fibroblastos y miofibroblastos, se les considera como las células responsables directamente del proceso fibrogénico. Pero a pesar de esto, no se conoce bien su tasa de crecimiento, especialmente en humanos; como se asocia ésta con la muerte celular por apoptosis y la presencia de  $\alpha$ -SMA; y cual es su patrón de expresión génica en relación con las moléculas de la matriz extracelular. Debido a esto se desarrollo el trabajo de investigación correspondiente a esta tesis.

## OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar la tasa de crecimiento en cultivos primarios de fibroblastos pulmonares derivados de pacientes con IPF y sujetos control.
2. Examinar el % de apoptosis espontánea en estos fibroblastos.
3. Evaluar el % de células positivas para  $\alpha$ -actina de músculo liso en estos cultivos.
4. Comparar la expresión del colágena génica de algunas moléculas responsables del metabolismo de la matriz extracelular en estas células.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. determinar la tasa de crecimiento con 1 % de FBS, en cultivos primarios de fibroblastos derivados de pulmones con IPF y pulmones control.
2. Estudiar la tasa de crecimiento con 10 % de FBS en estos cultivos.
3. Examinar el % de apoptosis espontánea en estos fibroblastos mediante citometría de flujo.
4. Evaluar el % de células positivas para  $\alpha$ -actina de músculo liso en estos cultivos por medio de citometría de flujo.
5. Analizar el tamaño de los fibroblastos positivos para  $\alpha$ -actina de músculo en relación con los negativos para esta proteína, mediante microscopía de fluorescencia.
6. Comparar la expresión del mRNA para colágena  $\alpha$ 1-[I], factor transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ 1), colagenasa-1 (MMP-1), gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9) y de los TIMPs-1, -2, -3 y -4, mediante la metodología de la RT-PCR en las mismas células.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

Todos los materiales para cultivo de células se adquirieron de Gibco BRL (Rockville, MD.) La tripsina, Yoduro de Propidio, el anticuerpo monoclonal para  $\alpha$ -actina de músculo liso conjugado con fluoresceína ( $\alpha$ -SMA-FITC; clone B4A) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La avidina–conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Avidina-FITC), el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína (anti-mouse IgG–FITC: 2º anticuerpo), la DNAsa libre de RNAsa grado citometría de flujo y el reactivo para proliferación celular WST-1, se obtuvieron de Boheringer Mannheim (Indianapolis, IN). Todos los demás reactivos utilizados para la realización de este trabajo fueron de grado analítico, grado cultivo celular, y en el caso de los métodos utilizados para el análisis de la expresión del mRNA fueron de grado Biología Molecular.

### **AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS**

Todos los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón humano que fueron utilizados en este estudio, se obtuvieron en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (58). Los fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF, n=5), se aislaron del tejido pulmonar obtenido mediante la técnica quirúrgica de biopsia pulmonar a cielo abierto. En estos pacientes la IPF se diagnosticó considerando las características clínicas, radiológicas y morfológicas de esta enfermedad (4,12). Los pacientes fueron 3 masculinos y 2 femeninos; 4 no-fumadores y un exfumador, su edad fue de  $57 \pm 5$  años y el tiempo que transcurrió desde su primera visita al INER hasta el desarrollo de síntomas graves fue de  $22 \pm 6$  meses.

Todos los pacientes mostraron un patrón funcional restrictivo (FVC:  $57 \pm 10$  % del predicho, TLC:  $62 \pm 9$  % del predicho) y falta de oxígeno (hipoxia) en reposo ( $53 \pm 7$  mmHg (valores normales para la ciudad de México  $59 \pm 8$  mmHg) la cual empeoraba con el ejercicio. La biopsia pulmonar fue obtenida usualmente una semana después de la admisión del paciente en hospitalización. Ninguno de ellos había sido tratado con corticoides o drogas inmunosupresoras al momento de obtener la biopsia.

Los fibroblastos control (n=5) se obtuvieron de pacientes sometidos a lobectomía/neumonectomía para la remoción de tumor pulmonar primario. De tejido pulmonar que no mostró evidencia histológica de enfermedad.

Los fibroblastos pulmonares se aislaron por dispersión con tripsina:EDTA (tripsina 0.05 mg/ml y EDTA 0.02 mg/ml), incubándolos durante 20 minutos a 37 °C, en medio de cultivo nutriente de Ham (F-12) libre de suero (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY). Una vez realizada la hidrólisis con tripsina, las células fueron recuperadas por centrifugación a 200 g, a 15 °C por 10 min, y se cultivaron a 37°C con una mezcla gaseosa de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire, en medio nutriente de Ham (F-12) conteniendo 10% de FBS, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y anfotericina 2.5 µg/ml. Todos los cultivos de fibroblastos utilizados para este estudio fueron de los pasajes 5 a 8.

## ENSAYO DE LA TASA DE CRECIMIENTO

Inicialmente se desarrolló un experimento para comprobar la relación de la absorbancia con el reactivo WST-1 (Boehringer Mannheim) en relación con el número de fibroblastos. Para este fin se sembraron desde 10,000 hasta 50,000 células, de 3 cultivos control y 3 derivados de IPF en medio de

cultivo conteniendo FBS 10 % y antibióticos. A las 24 horas se cambio el medio de cultivo por 100  $\mu$ l de medio sin suero y se le adicionaron 10  $\mu$ l del reactivo WST-1, después de colocar a las células 3 horas en el incubador metabólico incubación, se determinó la absorbancia a 450 nm corrigiéndola con la de 620 nm.

El análisis de la tasa de crecimiento se realizó en un lapso de 13 días, incubando las células con 1 ó 10 % de FBS, conteniendo antibióticos a 37 °C con la mezcla gaseosa de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire dentro del incubador metabólico. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos a razón de 10<sup>4</sup> células/pozo. El número de células en cada uno de los tiempos de estudio se determinó con el reactivo para proliferación celular WST-1 (13). Para este fin, el medio de cultivo se reemplazó por 100  $\mu$ l de medio fresco, al que se adicionaron 10  $\mu$ l del reactivo WST-1, las células se incubaron durante 3 horas más, y al término de estas se colectó el medio, en el cual se determinó la absorbancia a 450 nm corrigiéndola con la absorbancia a 620 nm en un lector para placas de ELISA (Abs<sub>450</sub>-Abs<sub>620</sub>).

El reactivo para proliferación celular WST-1, es una de las sales derivadas del tetrazolio y es oxidado por el sistema enzimático succinato deshidrogenasa mitocondrial de células metabólicamente activas o viables, produciendo como resultado un cromóforo soluble cuya concentración se determina en el medio de cultivo con las absorbancias ya citadas.

Los resultados del análisis de la tasa de crecimiento se expresaron como porcentaje, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{A_t - A_0}{A_0} \times 100 = \% \text{ de crecimiento.} \quad \text{En donde:}$$

$A_t$  = absorbancia al día 2, 4, 8, 11 ó 13  
 $A_0$  = absorbancia al día cero (basal)

## ANÁLISIS CITOFUOROMÉTRICO DE APOPTOSIS Y $\alpha$ -ACTINA DE MÚSCULO LISO

Se utilizó un citofluorómetro Partec (Partec model CA-III, flow cytometer), equipado con una lámpara de 25 mW para producir un rayo láser por excitación iónica con Argón, para excitación a 488 nm. Para el caso de la fluorescencia de Yoduro de Propidio (PI) se utilizó un filtro de 610 nm de absorbancia (long-pass), mientras que la detección de moléculas marcadas con fluoresceína fluorescente (FITC) fue a través de un filtro EM de 520 nm de absorbancia. Todos los análisis se realizaron después de la estandarización con microesferas fluorescentes (Coulter, Hialeah, FL), y los granos de amplificación inespecíficos debidos a restos celulares fueron descartados del análisis citofluorométrico (13).

Los fibroblastos utilizados para el análisis por citometría de flujo fueron cultivados hasta la fase de crecimiento semi-logarítmico, en medio de cultivo conteniendo 10 % de FBS y antibióticos. Posteriormente las células fueron recuperadas por digestión con tripsina:EDTA, centrifugadas a 300 g, y fijadas con 5 ml de etanol 70 % a 4 °C, adicionado gota a gota mientras las células se agitaban de manera constante durante 5 minutos. Las células fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

Todos los datos obtenidos de las determinaciones por citometría de flujo, fueron analizados y cuantificados mediante el software WINMDI (Scripps Institute, La Jolla, CA.), y con el análisis estadístico de rutina para cuadrantes obtenidos por compartimentalización de los histogramas bivariados. Los datos de la distribución del DNA fueron compartimentalizados dentro de las fases de ciclo celular con el software MULTICYCLE (Phoenix Flow Systems).

En todos los casos los dobletes de células se eliminaron de la compartimentalización a través del software residente para llenado de algoritmos basado en la posición de los picos sobre las posiciones 2N y 4N.

## ENSAYO DE APOPTOSIS ESPONTÁNEA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el análisis de apoptosis espontánea se utilizaron células previamente cosechadas por tripsinización, y fijadas con etanol 70 % a 4 °C, adicionado gota a gota mediante agitación constante por cinco minutos. En estas células se desarrolló la técnica del marcaje *in situ* de los extremos del DNA fragmentado (ISEL); éste análisis se relacionó con el logaritmo del tamaño celular, el cual se conoce como FALS (del ingles Forward Angle Light Scatter), utilizando para esto citometría de flujo. Las células se marcaron con dUTP-biotinilada, seguido de la detección con avidina-FITC (13,59).

Primero se eliminó el alcohol 70 % de la fijación de las células mediante centrifugaron a 300 g, a 4 °C por 10 min. Las células se incubaron con el buffer SSC conteniendo BSA 1 % en PBS pH 7.4, durante 45 min a 37 °C. Después fueron lavadas con 0.5 ml de PBS, se centrifugaron a 300 g a 4 °C por 10 min, y se incubaron con 100 µl de buffer ISEL conteniendo dUTP-biotinilado 10 µg/ml, a 17 °C durante 2 horas. Los fibroblastos se lavaron dos veces con 0.5 ml de PBS y se centrifugaron una vez mas a 300 g. Finalmente las células fueron incubadas con avidina- FITC/PBS 10 µg/ml por 45 min a 37 °C. y se analizaron mediante citometría de flujo.

Los resultados se expresaron como % de células positivas para apoptosis.



## ANÁLISIS DE $\alpha$ -ACTINA DE MÚSCULO LISO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para evaluar la proporción de fibroblastos positivos para  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), se eliminó primero el etanol al 70 % de la fijación lavando dos veces con PBS por centrifugación a 300 g, a 4 °C por 10 min. Posteriormente, las células se incubaron durante 1 h con el anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -actina de músculo liso humana marcado con isotiocianato de fluoresceína, con una concentración de 4  $\mu$ g/ml con BSA 1 % preparada en PBS pH 7.3, RNAsa libre de DNAsa 25  $\mu$ g/ml, a 37°C. Finalmente las células se lavaron y resuspendieron en PBS. Los experimentos de distribución del DNA se desarrollaron mediante tinción del DNA con Yoduro de Propidio 5  $\mu$ g/ml mediante citometría de flujo (13,59).

## MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES DE $\alpha$ -ACTINA DE MÚSCULO LISO

Los fibroblastos se cultivaron en medio nutriente conteniendo 10 % de FBS más antibióticos. Las células fueron cosechadas mediante tripsinización cuando llegaron a la fase de crecimiento semi-logarítmico. Las células se marcaron con el anticuerpo monoclonal dirigido contra  $\alpha$ -actina de músculo liso humana conjugado con Isitocianato de fluoresceína a una concentración de 10  $\mu$ g/ml ( $\alpha$ -AML-FITC; clone BA4), del mismo modo como se describió para el análisis por citometría de flujo. Las células se montaron en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia y se fotografiaron con un microscopio de epifluorescencia y contraste de fases (Olympus EMT-2, Tokio, Japón), equipado con filtro para detección de

fluorescencia de isotiocianato de fluoresceína (FITC), y cámaras para color y escalas de grises. El diámetro de las células positivas y negativas al marcaje de  $\alpha$ -actina de músculo liso fue determinado por medición automatizada de grupos de 50 células, utilizando el programa para análisis de imágenes MOCHA (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

## MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA APOPTOSIS

La detección de células en proceso de apoptosis se desarrolló mediante tinción con Yoduro de Propidio (PI) en fibroblastos sembradas en placas de 24 pozos. Las placas se centrifugaron a 300 g a 4 °C durante 5 min, y las células se fijaron incubándolas con etanol 70 % a 4 °C durante 30 minutos. Las células fueron incubadas con RNAsa libre de DNAsa 1 mg/ml (13,53,54) en PBS conteniendo PI 5  $\mu$ g/ml. Para cuantificar la proporción de fibroblastos con núcleos fragmentados, la cromatina teñida se visualizó mediante microscopía fluorescente (intensidad fluorescente en  $\lambda > 590$  para PI), utilizando un mínimo de 4 campos por pozo y 4 pozos por cultivo. Se recopilaron los datos de tres diferentes cultivos primarios normales y tres derivados de IPF.

Los resultados se expresaron como % de apoptosis.

## EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL

El RNA total fue extraído de 3 diferentes cultivos primarios de pacientes con IPF y 3 pulmones control. El RNA total se purificó utilizando el método de Chomcynski y Sacchi (61), que combina la extracción de

RNA con isotiocianato de guanidina, fenol y cloroformo, obteniéndose el RNA con alto grado de pureza y sin degradación. El método consistió en adicionar 2 ml por cada 25 cm<sup>2</sup> de área celular de una solución desnaturante que contenía isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM, sarcosil 0.5%, 2-mercaptoetanol 0.1 M pH 7.0. Esta suspensión se transfirió a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml y se le adicionaron 200 µl de acetato de sodio 2 M pH 4.0, conteniendo 2 ml de fenol saturado en agua y 0.4 ml de cloroformo. Después de agitar las muestra por 10 segundos, se incubaron en hielo por 15 minutos, y posteriormente se centrifugaron a 10,000 g, a 4 °C durante 20 min, sin frenado.

El RNA obtenido en la fase acuosa superior fue precipitado con un volumen igual de isopropanol frío por 24 hrs a -70°C y se centrifugó a 10,000 g a 4 °C durante 20 min sin frenado. Después de decantó el sobrenadante y la pastilla se mantuvo a 4 °C. Se resuspendió con 300 µl de la misma solución desnaturante citada más arriba. Posteriormente se transfirió a otro tubo para microcentrífuga de 1.5 ml, y se adicionaron 30 µl de acetato de sodio 3 M pH 5 más 825 µl de etanol a 4 °C. Se incubó durante 3 horas a -20 °C y se centrifugó a 10,000 g, a 4 °C por 20 min, sin frenado. La pastilla resultante fue disuelta en 20 µl de buffer Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 7.0). La pureza del RNA el cual co-purifica con proteínas, se determinó mediante la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm, disolviendo el RNA con buffer TE; la pureza del RNA obtenido se consideró aceptable, sí la relación obtenida de la absorbancia a 260/280 nm se encontraba dentro del rango 1.8-2.2. Esto debido a que el RNA absorbe principalmente luz UV de 260 nm y las proteínas fundamentalmente luz UV de 280 nm.

## TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

En todos los ensayos se utilizó el RNA total. Para evaluar los transcritos se desarrolló la técnica de conversión del RNA a cDNA mediante retrotranscripción con la enzima transcriptasa reversa, seguida de la amplificación del cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos específicos, aplicando un ensayo semicuantitativo, y utilizando un termociclador (Perkin-Elmer modelo 9,600. Branchburg, NJ).

El RNA total fue incubado con 1 unidad de DNAsa (Gibco/BRL) para eliminar el DNA genómico. El RNA se mezcló con el buffer para retrotranscripción (RT), el cual contenía  $MgCl_2$  5 mM, KCl 50 mM, tris-HCl 10 mM pH 8.3, desoxirribonucleótidos (dNTPs) 0.5 mM, mezcla de hexámeros aleatorios (random hexamers) 2.5  $\mu$ M, inhibidor de RNAsa 2.5 U/ $\mu$ l y enzima Taq DNA polimerasa 1 U/ $\mu$ l (Perkin Elmer) en un volumen final de 25  $\mu$ l.

Una vez obtenidos los cDNA, se utilizaron los primers sense y antisense específicos para su amplificación mediante PCR, utilizando los primers que se indican en la **tabla 1**.

Para el análisis semi-cuantitativo mediante PCR, se utilizó un competidor interno del cDNA para la enzima GAPDH, que tiene un tamaño de 240 pb.

### PCR COMPETITIVO

EL PCR para GAPDH se desarrolló con el cDNA total con una mezcla de reacción de 25  $\mu$ l finales, la cual estaba constituida por Tris-HCl 20 mM pH 8.3, KCl 50 mM,  $MgCl_2$  2 mM, dNTPs 200  $\mu$ M, 1  $\mu$ M de los primers sense

**Tabla 1.** Secuencia de los primers (oligonucleótidos) sense y antisense utilizados en el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR.

| Gene                        | Primer Sense (5' → 3')               | Primer antisense (5' → 3')       | Producto (bp) | Fg/ ensayo (GAPDH) | número de Ciclos | Referencia ó número de acceso (GeneBank) |
|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------|--------------------|------------------|--|
| GAPDH                       | CCCCTTCATTGACCTCAACT                 | TTGTCATGGATGACCTTGGC'            | 395           |                    | 25               | AF261085                                 |
| MMP-1                       | AGCACATGACTTTCCTGGAATT<br>GGC        | ATTTTGTGTTAGAAGAGTTATCC          | 619           | 50                 | 27               | NM002421                                 |
| MMP-2                       | TGACATCAAGGGCATTTCAGG<br>AGC         | GTCCGCCAAATGAACCGGTCCT<br>TG     | 180           | 150                | 45               | a.                                       |
| MMP-9                       | GTGCTGGGCTGCTGCTTTGCT<br>G           | GTCGCCCTCAAAGGTTTGGAAAT          | 303           | 150                | 40               | b.                                       |
| Colágena<br>$\alpha 1$ -[I] | CGATGGATTCCAGTTCGAGTA                | GTTTACAGGAAGCAGACAGG             | 405           | 750                | 45               | c.                                       |
| TIMP-1                      | GCGGATCCAGCGCCCAGAGG<br>ACACC        | TTAAGCTTCCACTCCGGGCAGG<br>ATT    | 765           | 100                | 27               | c.                                       |
| TIMP-2                      | CCGAATTCTGCAGCTGCTCCC<br>CGGTGCACCCG | GGAAGCTTTTATGGGTCTCGA<br>TGTCGAG | 590           | 100                | 30               | d.                                       |
| TIMP-3                      | CAGTACATTACACGGAAGC                  | TCTGTGGCATTGCTGATGCT             | 392           | 50                 | 45               | NM000362                                 |
| TIMP-4                      | CCAGAGGTCAGGTGGTAA                   | ACAGCCAGAAGCAGTATC               | 446           | 50                 | 45               | NM003256                                 |
| TGF $\beta$ 1               | TGGAAGTGGATCCACGCGCCC<br>AAGG        | GCAGGAGCGCACGATCATGTTG<br>GAC    | 242           | 100                | 30               | e.                                       |

a. Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156: 240-247

b. Lemjabbor H, Gosset P, Lechapt-Zatcman E, Franco-Montoya ML, Wallaert B, Harf A, and Lafuma C. Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP-9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1999; 20: 903-913.

c. Thur J, Nischt R, Krieg T, and Hunzelmann N. Quantitative analysis of  $\alpha 1$ (I) procollagen transcripts *in vivo* by competitive polymerase chain reaction. *Matrix Biol.* 1996; 15: 49-52

d. Brew k, Dinakarandian D, and Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure, and function. *Biochem. Biophys. Acta.* 2000; 1477: 267-283

e. Napoli J, Prentice D, Niinami C, Bishop A, Desmond P, and McCaughan GW. Sequential increases in the intrahepatic expression of epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor  $\beta$  in bile duct ligated rat model of cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26: 624-633

y antisense específicos, y una unidad de la enzima Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer). Se co-amplificaron 4 diluciones seriadas del competidor estándar (5, 20, 50 y 100 pg), junto con 1  $\mu$ l del cDNA total. Las condiciones de ciclaje fueron: 40 ciclos a 94°C/ 30 s, 60°C/30 s, 72°C/30 s. Para determinar la cantidad de GAPDH en las muestras con base en la del cGAPDH se elaboraron geles de agarosa al 1.5 % conteniendo bromuro de etidio, en los que se cargaron 8  $\mu$ l de cada una de las muestras, los geles se fotografiaron mediante una cámara digital y con la ayuda del "software" se desarrolló el análisis densitométrico de las bandas para calcular así la intensidad neta (Kodak digital science electrophoresis documentation and analysis System 120, Alemania). La relación de GAPDH/cGAPDH se ajustó en función de las cantidades conocidas del cGAPDH; con el punto de equivalencia en el cual la cantidad de ambas sondas fuera 1:1, se calculó la concentración del GAPDH en cada una de las muestras problema.

Los ensayos de la PCR se desarrollaron con cada una de las muestras, pero ahora utilizando como constante la cantidad de muestra que tuviera una concentración conocida del cDNA para GAPDH.

En todos los experimentos de la PCR los productos de la amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 % conteniendo bromuro de etidio; los geles fueron fotografiados con la cámara digital y se obtuvo la intensidad neta de las bandas mediante densitometría con el sistema para imágenes ya citado.

Los resultados del análisis por PCR se expresaron como la media  $\pm$  d.e. de la intensidad neta en las bandas del DNA amplificado en las células derivadas de IPF en relación con las de los controles.

## ENSAYO DE BIOSÍNTESIS DE COLÁGENA

La concentración de colágena sintetizada y secretada al medio se determinó mediante la cantidad de colágena radiactiva, precipitada con ácido tricloroacético (TCA) y solubilizada mediante hidrólisis con colagenasa bacteriana ultrapura (de *Clostridium Histolyticum*), utilizando el método de Peterkofsky y Diegelman (58). Para esto, se cultivaron 250,000 fibroblastos/pozo en placas para cultivo celular de 6 pozos, en medio de cultivo conteniendo FBS 10 % durante 24 horas; los fibroblastos se lavaron 4 veces con medio sin suero y se le adicionaron a cada pozo 2 ml de medio sin suero más ácido ascórbico 1.5  $\mu\text{g/ml}$  y  $\beta$ -aminopropionitrilo 1.5  $\mu\text{g/ml}$  pH 7.4.

Los fibroblastos se incubaron durante una hora a 37 °C, y después se les adicionaron 15  $\mu\text{Ci}$  L-(2,3,4,5- $^3\text{H}$ )-prolina (New England Nuclear, Boston MA), y se mantuvieron por 6 horas más en el incubador metabólico a 37 °C. El medio de cultivo fue colectado y a cada muestra se le agregaron 20  $\mu\text{g}$  de BSA. Las muestras se dializaron contra agua desionizada a 4 °C, conteniendo PMSF 1 mM, NEM 2.5 mM, EDTA 10 mM y  $\text{NaN}_3$  0.001%, hasta alcanzar 30 cpm en la solución de diálisis (valor del blanco). Posteriormente las muestras se dializaron contra agua desionizada a 4 °C, para eliminar totalmente los inhibidores de proteinasas. Finalmente las muestras fueron liofilizadas a sequedad.

El material liofilizado fue resuspendido en 1 ml de buffer Tris-HCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM pH 7.6. De este ml se obtuvieron 2 alícuotas de 460  $\mu\text{l}$  y se colocaron en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml. Las muestras se incubaron en ausencia o presencia de 3,600  $\mu\text{g/ml}$  de colagenasa ultrapura (derivada de *Clostridium histolyticum*), en buffer Tris 50 mM y  $\text{CaCl}_2$  20 mM. Las muestras se incubaron durante 3 horas en un baño metabólico a 37 °C

con agitación constante. Al término de la incubación las muestras se colocaron en hielo y se les añadieron 500  $\mu$ l de TCA 10 % conteniendo ácido tánico 0.5 %, a 4°C y recién preparado. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 2,000 g, a 4°C por 15 min. El sobrenadante se colectó y el precipitado fue resuspendido en 500  $\mu$ l de TCA 5 %, con ácido tánico 0.25 %, y se centrifugó nuevamente a 2,000 g, a 4 °C por 15 min. En esta segunda centrifugación el sobrenadante se colectó y se juntó con el primero.

Finalmente se determinaron las cpm en 10 ml de medio para centelleo líquido (Aquasol; New England Nuclear, Boston MA). Las cpm se determinaron en un contador para centelleo líquido (Beckman LS6000, SE). Las cpm obtenidas de la degradación con colagenasa ultrapura se consideraron como cpm en colágena (proteínas colagénicas degradadas).

Por otro lado, el precipitado se colocó en una ampolleta de vidrio y se hidrolizó con 2 ml de ácido clorhídrico 6 N durante 48 horas a 70 °C. El producto hidrolizado se filtró y al líquido obtenido se le determinaron las cpm con 10 ml de Aquasol. Estas cpm se consideraron como cpm en proteínas no colagénicas.

Los resultados de la biosíntesis de colágena se expresaron como % de síntesis de colágena respecto a proteínas totales, para lo cual se aplicó la siguiente fórmula (58):

$$\% \text{ de síntesis de colágena} = \frac{\text{cpm en colágena}}{(\text{cpm en proteínas no colagénicas} \times 5.4) + \text{cpm en colágena}} \times 100$$



## CUANTIFICACIÓN DE TGF- $\beta$

Para la evaluación de las concentraciones de TGF $\beta$ 1 se utilizaron los medios de cultivo de 350,000 células incubadas por 24 horas en medio libre de FBS, con el uso de un paquete comercial sensitivo y específico para un ensayo por inmuno-absorbencia (Human TGF $\beta$ 1 Immunoassay, R & D: Minneapolis, MN) (62). Los medios de cultivo fueron activados con HCl 0.2 mM durante 10 min, con la posterior neutralización adicionando NaOH 0.004 N y HEPES 10 mM. Se utilizaron 200  $\mu$ l de cada muestra por duplicado los cuales se incubaron 3 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se les agregaron 200  $\mu$ l del TGF $\beta$ 1 conjugado y se incubaron 18 horas a 4 °C, después se adicionó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 mM para detener la reacción. Finalmente se determinó la absorbancia a 450 y se corrigió con la absorbancia a 540 nm.

Los resultados de la concentración para este factor de crecimiento se expresaron como media  $\pm$  d.e de los pg TGF $\beta$ 1 / $\mu$ g de proteína.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones fueron desarrolladas mediante la prueba t de Student para observaciones pareadas. En los casos en que se analizaron más de 2 grupos se utilizó las prueba del ANOVA, corregida con el análisis de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los valores con  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

## RESULTADOS

### ANÁLISIS DE LA TASA DE CRECIMIENTO

Inicialmente se desarrolló la determinación de la absorbancia con el reactivo WST-1 en relación al número de células sembradas, desde  $10 \times 10^3$  hasta  $50 \times 10^3$  células, y se mostró una relación proporcional en esta evaluación (**figura 1**). Posteriormente los fibroblastos control y derivados de IPF fueron cultivados con 1 o 10 % de FBS en un lapso de 13 días. El número de células se determinó con el reactivo para proliferación celular WST-1, en los días cero (basal), 2, 4, 8, 11 y 13. Como se ilustra en la **figura 2** los fibroblastos pulmonares derivados de pacientes IPF incubados con 1 % de FBS mostraron una tasa de crecimiento significativamente menor que la de los fibroblastos control, desde el día 4 hasta el 13 del análisis (IPF vs. controles:  $8.75 \pm 35$  vs.  $254 \pm 35.7\%$ ,  $p < 0.001$ , al día 11; y  $13.3 \pm 38.5$  vs.  $294.6 \pm 37 \%$ ,  $p < 0.001$ , al día 13).

Cuando analizamos la tasa de crecimiento en medio conteniendo 10 % de FBS observamos resultados similares, tal como se muestra en la **figura 3**.

### ANÁLISIS DEL % DE APOPTOSIS Y DE $\alpha$ -ACTINA DE MÚSCULO LISO MEDIANTE CITOFUOROMETRÍA.

El análisis in situ del marcaje de los extremos del DNA fragmentado (ISEL) se utilizó para evaluar el porcentaje de fibroblastos que presentan apoptosis espontánea. El análisis citofluorométrico de apoptosis mediante la técnica del ISEL en relación con el tamaño de las células (FALS), se muestra gráficamente tomando como ejemplo el resultado en uno de los

cultivos primarios de fibroblastos derivados de IPF (**figura 4 A**) y uno de fibroblastos control (**figura 4 B**). Asimismo, en la **tabla 2** se muestran los datos numéricos de este análisis. Los fibroblastos derivados de pulmones con IPF mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células con apoptosis espontánea cuando se compararon con los controles:  $31.4 \pm 6.9$  vs.  $15.0 \pm 7.4$  %;  $p < 0.008$ . Adicionalmente, la presencia de células apoptóticas se analizó con la tinción de Yoduro de Propidio (**figura 5 A** y **figura 5 B**). Como se muestra en la **figura 5 C**, las células derivadas de IPF mostraron un incremento significativo en la proporción de células apoptóticas en comparación con los controles ( $43 \pm 4.9$  vs.  $10 \pm 1.6$  % en los controles;  $p < 0.01$ ).

## ANÁLISIS DE $\alpha$ -ACTINA DE MÚSCULO LISO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

El porcentaje de fibroblastos inmunorreactivos para el anticuerpo monoclonal contra  $\alpha$ -SMA, fue examinado tanto por citofluorometría de flujo, en relación con el contenido de DNA, como por el análisis de las imágenes obtenidas por observación con microscopía fluorescente. La evaluación mediante citofluorometría en relación con el contenido de DNA se muestra en la **figura 6** y en la **tabla 2**. Los diferentes cultivos primarios de fibroblastos derivados de pacientes con IPF mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células positivas para  $\alpha$ -SMA respecto a los fibroblastos control (IPF vs. controles:  $62.8 \pm 25.2$  vs.  $14.8 \pm 11.6$  %;  $p < 0.004$ ).

La tinción inmunocitoquímica para  $\alpha$ -SMA con el análisis por microscopía fluorescente, se utilizó para evaluar los diámetros celulares en las imágenes fotográficas de las células positivas respecto a las negativas

en campos de 50 células/grupo. Este análisis mostró que tanto en las células derivadas de IPF como en los controles, las células positivas para  $\alpha$ -SMA mostraron diámetros mayores a los de las células negativas (IPF:  $38.1 \pm 8.2 \mu\text{m}$  vs.  $26.9 \pm 7.4 \mu\text{m}$   $p < 0.05$ ; controles:  $35.8 \pm 7.0 \mu\text{m}$  vs.  $25.7 \pm 5.8 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.05$ ).

## EXPRESIÓN GÉNICA EN FIBROBLASTOS DERIVADOS DE IPF Y CONTROLES

Los resultados del análisis semi-cuantitativo obtenido mediante la técnica de la PCR, para la expresión de los diversos mRNAs en los cultivos primarios de fibroblastos derivados de IPF y los controles se muestran en las **figuras 7 y 8**.

El análisis densitométrico de las bandas del GAPDH en los diferentes fibroblastos utilizados en este experimento no mostró diferencia significativa. Esto indica que la cantidad de DNA utilizado para la amplificación en los distintos grupos de células fue similar (controles:  $5,314 \pm 96$ ; IPF:  $5377 \pm 85$ ).

El análisis semicuantitativo de la expresión de colágena  $\alpha 1$  [I] reveló una expresión más alta en los fibroblastos derivados de IPF en relación con los fibroblastos control ( $9,418 \pm 1,217$  vs.  $5,173 \pm 1,559$  respectivamente;  $p < 0.02$ ). Estos resultados correlacionaron con el ensayo de la síntesis de colágena, la cual fue mayor en las células derivadas de IPF ( $53.1 \pm 5.2$  vs.  $28.6 \pm 3.7$  en los controles;  $p < 0.01$ ).

En cuanto a la expresión del mRNA del TGF $\beta$ 1 (**figura 7**), se observó también un incremento significativo en los fibroblastos derivados de IPF:  $12,881 \pm 2,033$  vs.  $6,902 \pm 2,782$  en los controles; ( $p < 0.05$ ); sin embargo, el análisis de las concentraciones de ésta proteína en los medios de cultivo

mostró resultados heterogéneos y no se encontraron diferencias significativas (IPF:  $96 \pm 23$  vs.  $120 \pm 34$  pg/mg de proteína en los controles).

La colagenasa-1 fue expresada solamente en uno de tres cultivos primarios derivados de IPF y de igual manera en uno de tres cultivos control, sin observarse diferencia significativa.

En relación a la expresión de gelatinasa-A (MMP-2) no se encontraron diferencias significativas entre los fibroblastos de IPF y controles ( $6,037 \pm 1,641$  vs  $3,922 \pm 664$  respectivamente).

En contraste, la gelatinasa-B (MMP-9) fue expresada en 2 de tres cultivos derivados de IPF ( $30,414 \pm 1,416$ ) y en proporción mucho menor solamente en uno de tres cultivos de fibroblastos control analizados (3,615), por lo que su expresión mostró diferencias al comparar ambos tipos de fibroblastos (**figura 7**).

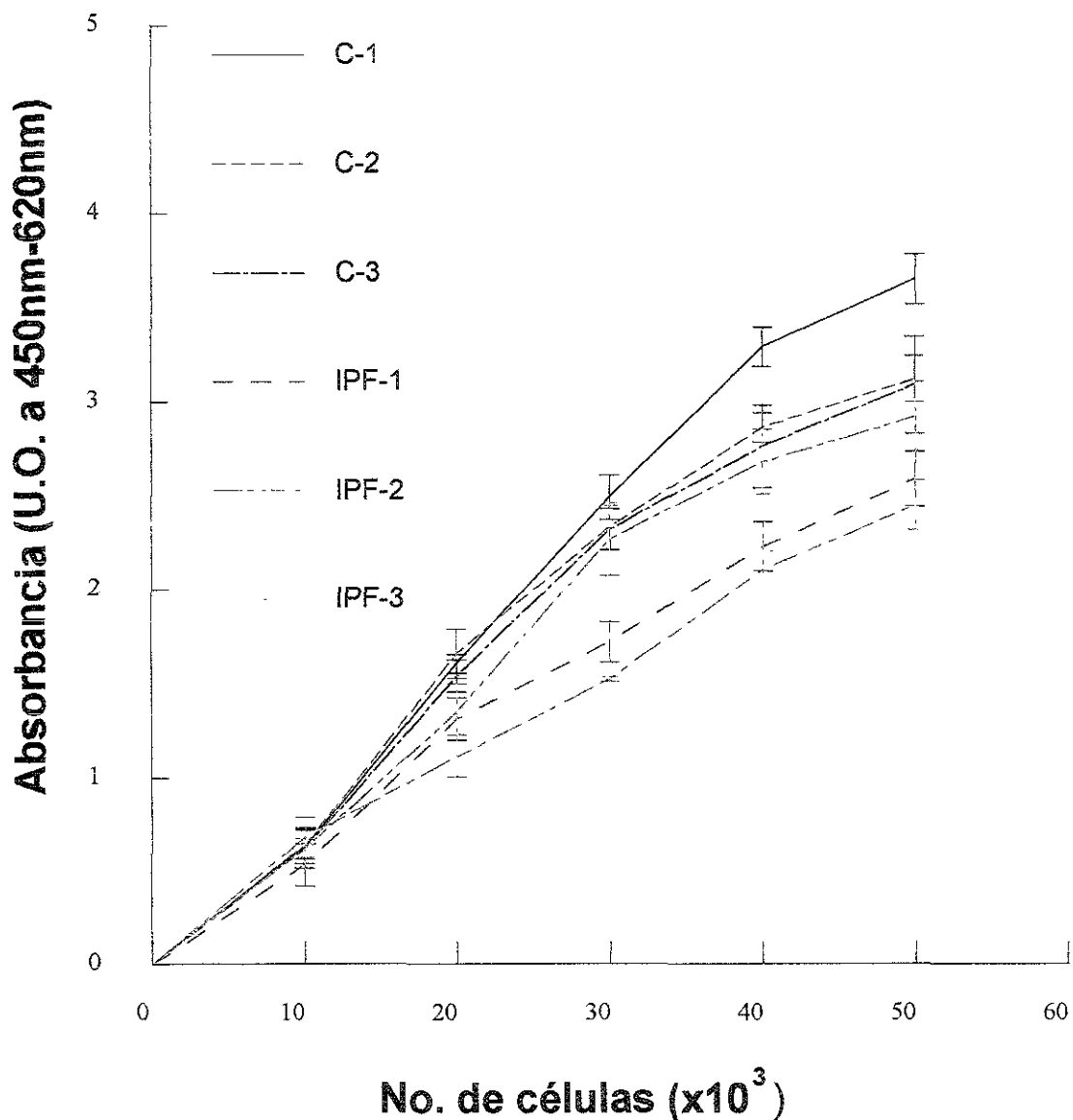
Los resultados para la evaluación por PCR para los TIMP-1, -2, -3 y -4, se muestra en la **figura 8**.

El Análisis de la expresión del TIMP-1, mostró un incremento de dos veces en los fibroblastos derivados de IPF al compararlos con los fibroblastos control ( $75,195 \pm 10,119$  vs.  $38,479 \pm 13,846$ ;  $p < 0.02$ ).

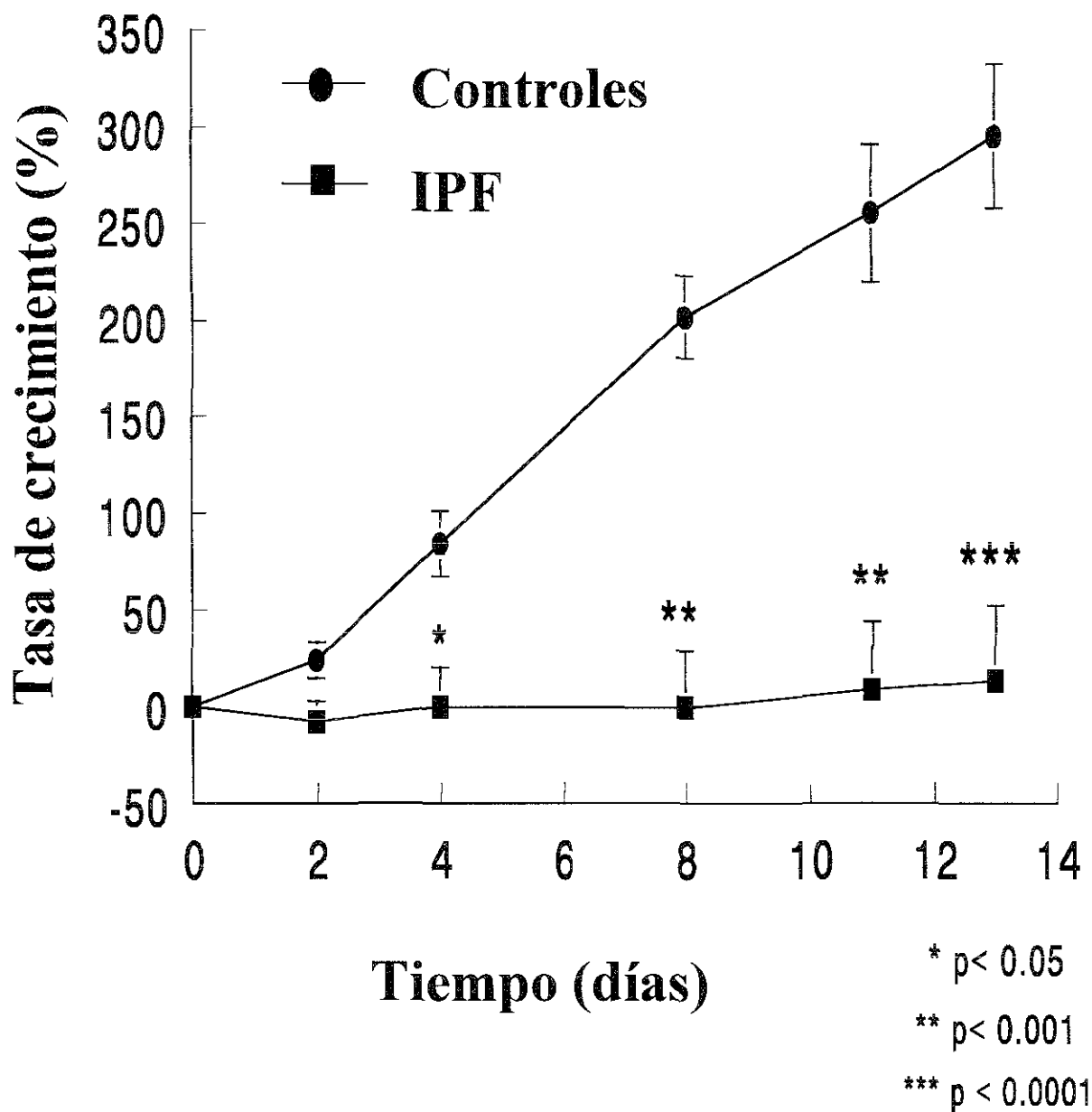
En el caso de la expresión de TIMP-2 también se observó un incremento de dos veces en las células derivadas de IPF respecto a los controles ( $20,935 \pm 6,451$  vs.  $9,449 \pm 4,322$ ;  $p < 0.05$ ).

TIMP-3 y TIMP-4 se expresaron principalmente en los fibroblastos de IPF y únicamente en uno de los cultivos control.

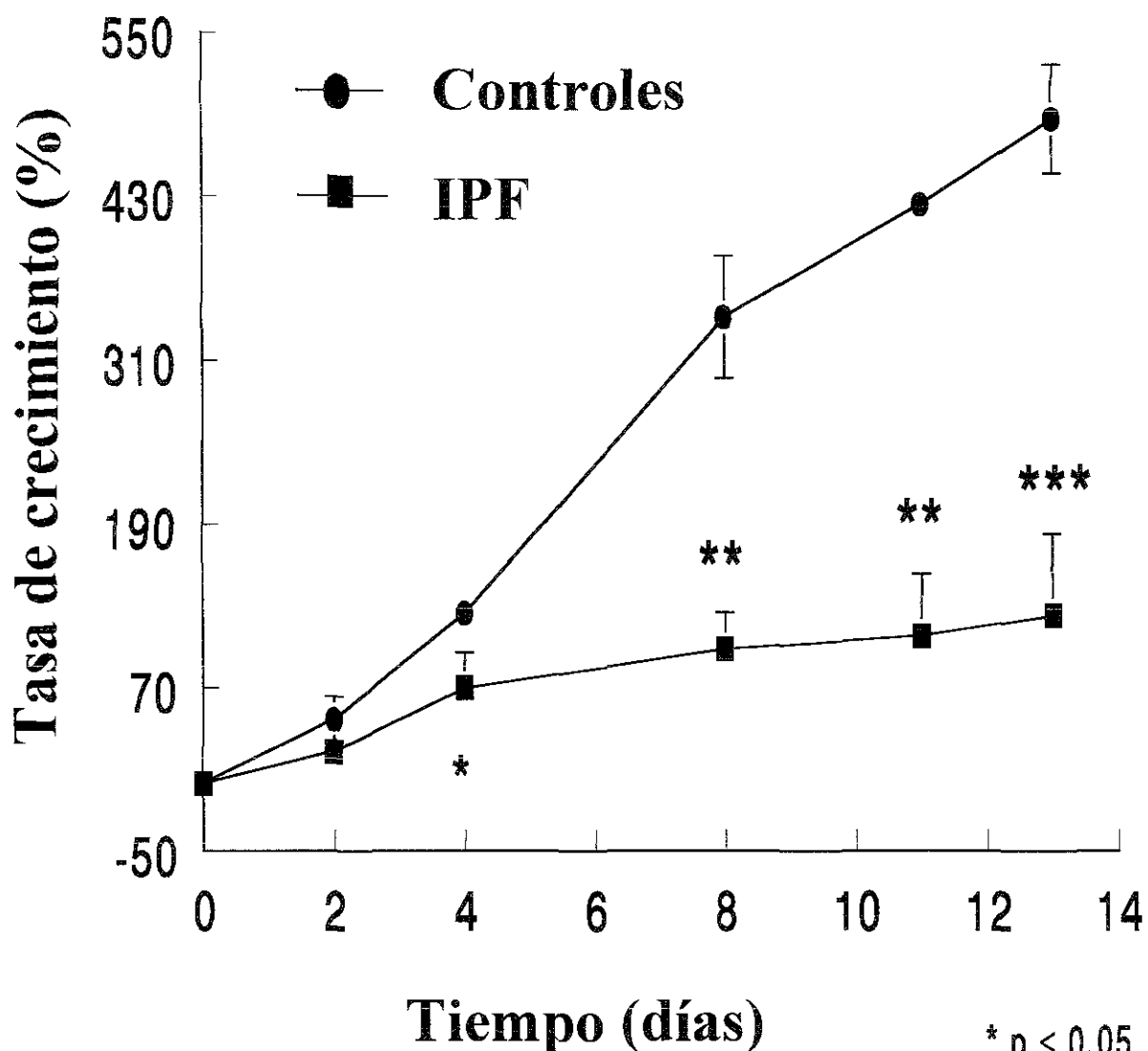
La expresión de los cuatro TIMPs fue mayor en los fibroblastos derivados de pulmones con IPF en relación con los controles (**figura 8**).



**Figura 1.** Relación de la absorbancia (450nm-620nm en U.O.) con el reactivo para proliferación celular WST-1 en función al número de fibroblastos: C-1, C-2 y C-3 fibroblastos derivados de pulmones control; IPF-1, IPF-2 y IPF-3 fibroblastos derivados de pulmones con fibrosis pulmonar idiopática. Cada punto representa la media  $\pm$  d.e. 4 determinaciones.



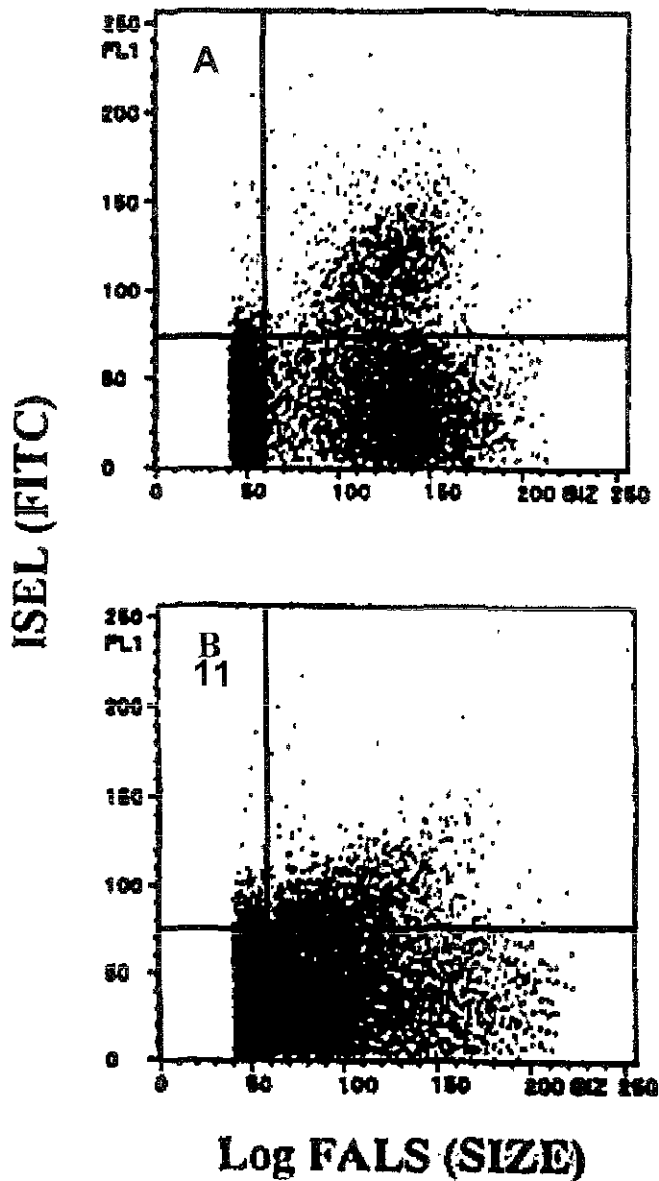
**Figura 2.** Análisis de la tasa de crecimiento en cultivos primarios de fibroblastos pulmonares humanos incubados con FBS 1 %, mediante una cinética ensayada durante 13 días. Fibroblastos de pulmones control (círculos negros); Fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF; Cuadros negros). El número de células fue estimado en los tiempos indicados con el reactivo para proliferación celular WST-1 (ver métodos), determinando la absorbancia a 450 nm y corregida con la de 620 nm. Cada punto representa la media  $\pm$  d.e. de cinco diferentes líneas de fibroblastos, cada una de ellas ensayadas por cuadruplicado;  $p < 0.05$  a los 4 días;  $p < 0.01$  a los 8 y 11 días;  $p < 0.0001$  a los 13 días (analizados con la prueba ANOVA-Bonferroni).



\*  $p < 0.05$   
 \*\*  $p < 0.001$   
 \*\*\*  $p < 0.0001$

**Figura 3.** Análisis de la tasa de crecimiento en cultivos primarios de fibroblastos pulmonares humanos incubados con FBS 10 %, mediante una cinética de 13 días. Fibroblastos pulmonares control (círculos negros); Fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (ÍPF; Cuadros negros). El número de células fue estimado en los tiempos indicados con el reactivo para proliferación celular WST-1 (ver métodos), determinando la absorbancia a 450 nm y corrigiéndola con la de 620 nm. Cada punto representa la media  $\pm$  d.e. de cinco diferentes líneas de fibroblastos, cada una de ellas ensayadas por cuadruplicado;  $p < 0.05$  a los 4 días;  $p < 0.01$  a los 8 y 11 días; y  $p < 0.0001$  a los 13 días (analizados con la prueba ANOVA-Bonferroni).

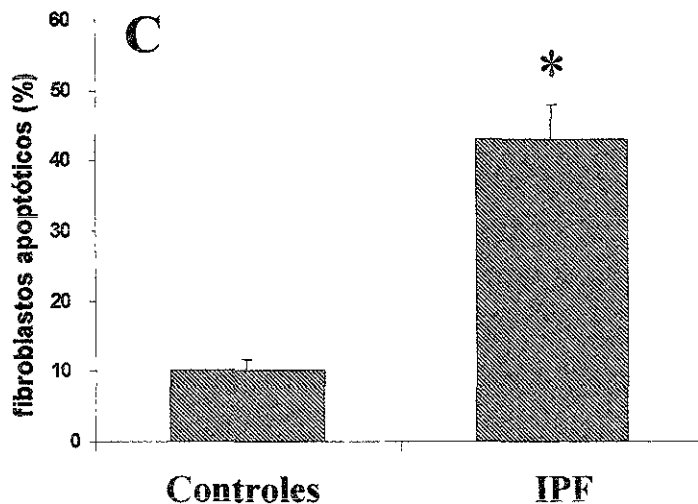
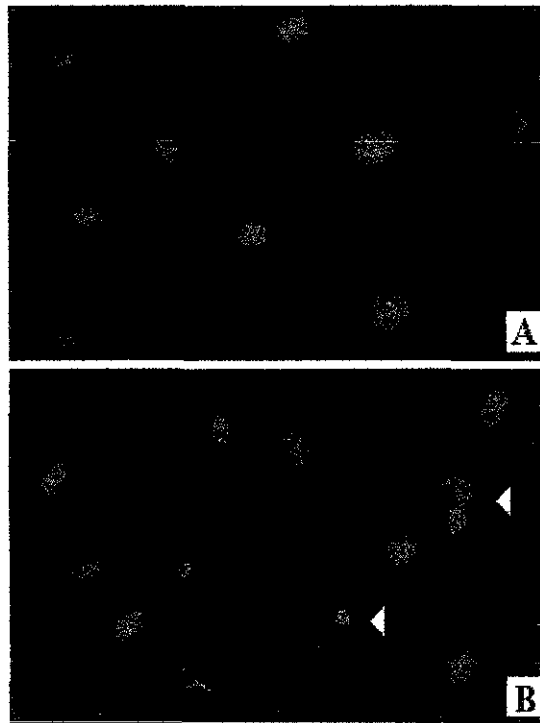




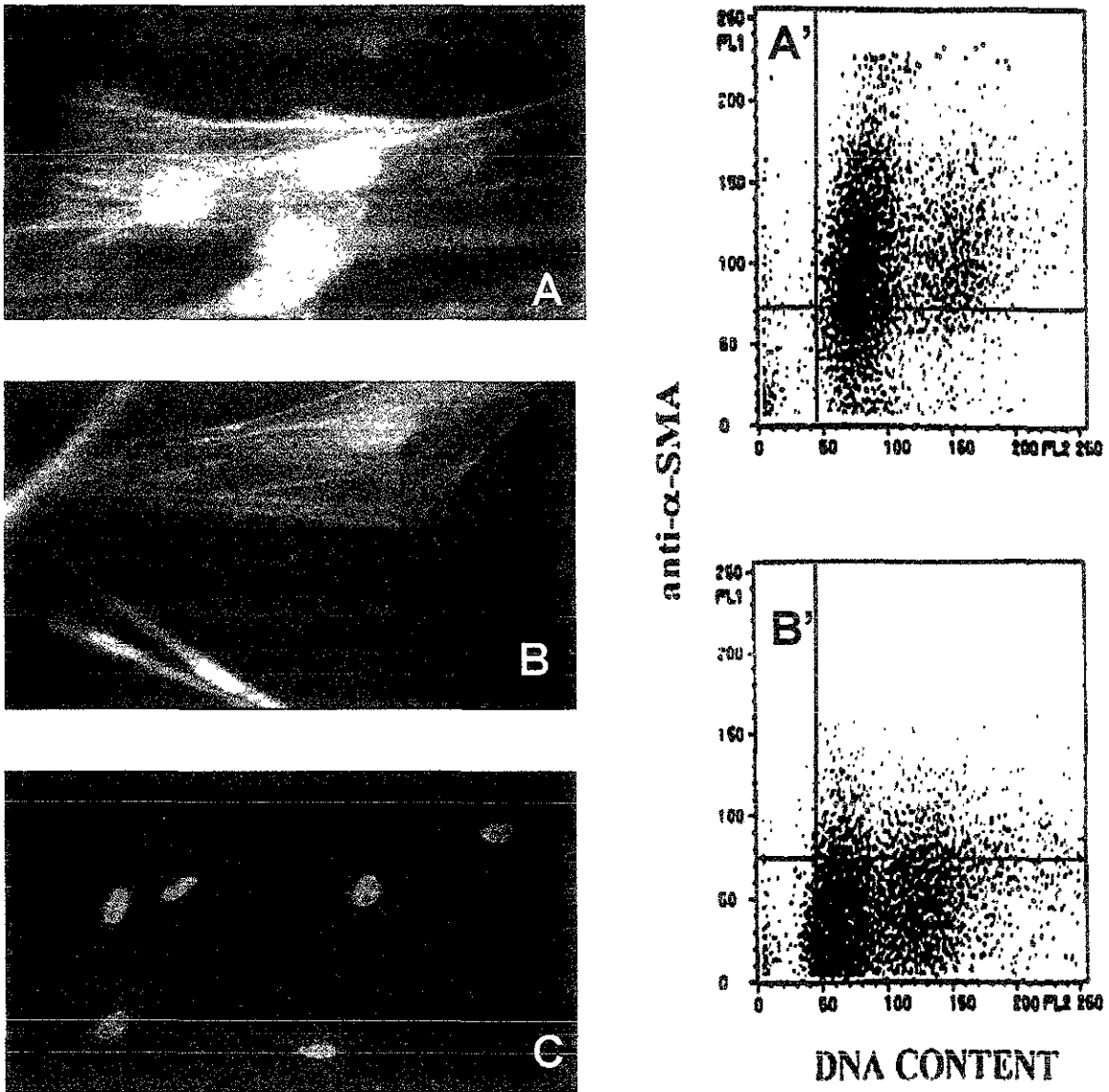
**Figura 4.** Imágenes obtenidas del análisis bivariado mediante citometría de flujo, para el marcaje in situ de los extremos de DNA fragmentado (ISEL), en relación con el logaritmo del tamaño celular (FALS), en cultivos de fibroblastos primarios de pulmón humano; **A:** un ejemplo de fibroblastos derivados de un paciente con IPF; **B:** un ejemplo de fibroblastos derivados de un sujeto control.

| <b>FIBROBLASTOS<br/>(cultivo primario)</b> | <b>Células positivas<br/>para <math>\alpha</math>-SMA<br/>(%)</b> | <b>células positivas para<br/>apoptosis (ISEL)<br/>(%)</b> |
|--|---|--|
| N-1  | 6   | 16   |
| N-2  | 4   | 18   |
| N-3  | 11  | 19   |
| N-4  | 21  | 2  |
| N-5  | 32  | 20   |
| <b>x <math>\pm</math> d.e.</b>             | <b>14.8 <math>\pm</math> 11.6</b>                                 | <b>15.0 <math>\pm</math> 7.4</b>                           |
| <i>IPF-1</i>                               | 84  | 32   |
| <i>IPF-2</i>                               | 80  | 26   |
| <i>IPF-3</i>                               | n.d.  | 43   |
| <i>IPF-4</i>                               | 58  | 27   |
| <i>IPF-5</i>                               | 29  | 29   |
| <b>x <math>\pm</math> d.e.</b>             | <b>62.8 <math>\pm</math> 25.2</b>                                 | <b>31.4 <math>\pm</math> 6.9</b>                           |

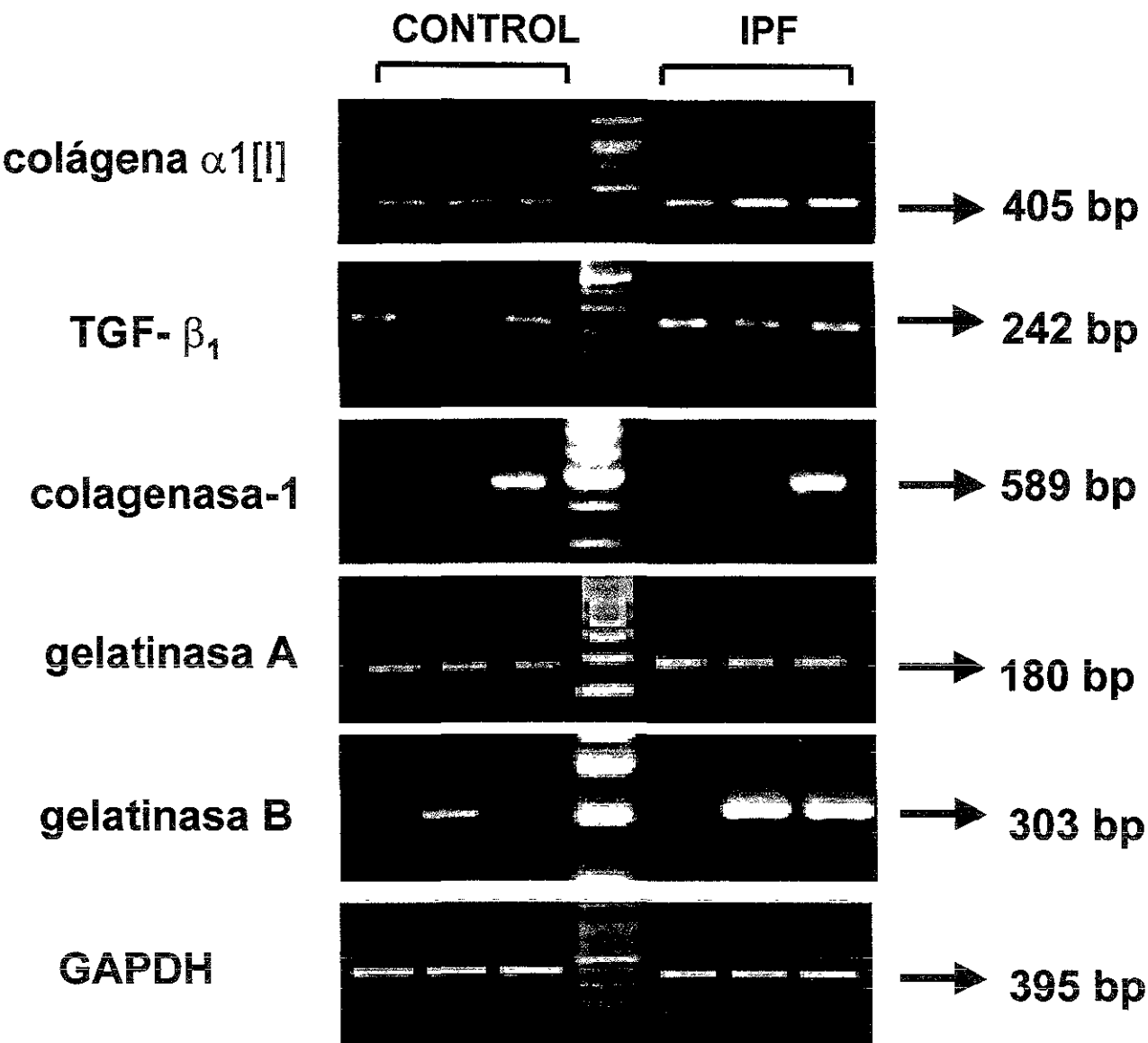
**Tabla 2.** Datos numéricos comparativos para el análisis de la positividad a la inmunorreactividad con el anticuerpo monoclonal dirigido contra  $\alpha$ -actina de músculo liso humana ( $\alpha$ -SMA), y la apoptosis evaluada mediante el ensayo marcaje terminal *in situ* de los de los extremos del DNA fragmentado (ISEL). En ambos casos ensayado por citometría de flujo en 5 cultivos primarios derivados de pulmones control (N) y 5 derivados de pulmones con (IPF) (ver métodos). Se indica x  $\pm$  d.e. del % en cada cultivo primario. El análisis mostró diferencia significativa tanto para  $\alpha$ -SMA (p < 0.01) como para ISEL (p < 0.008). n.d. = valor no determinado.



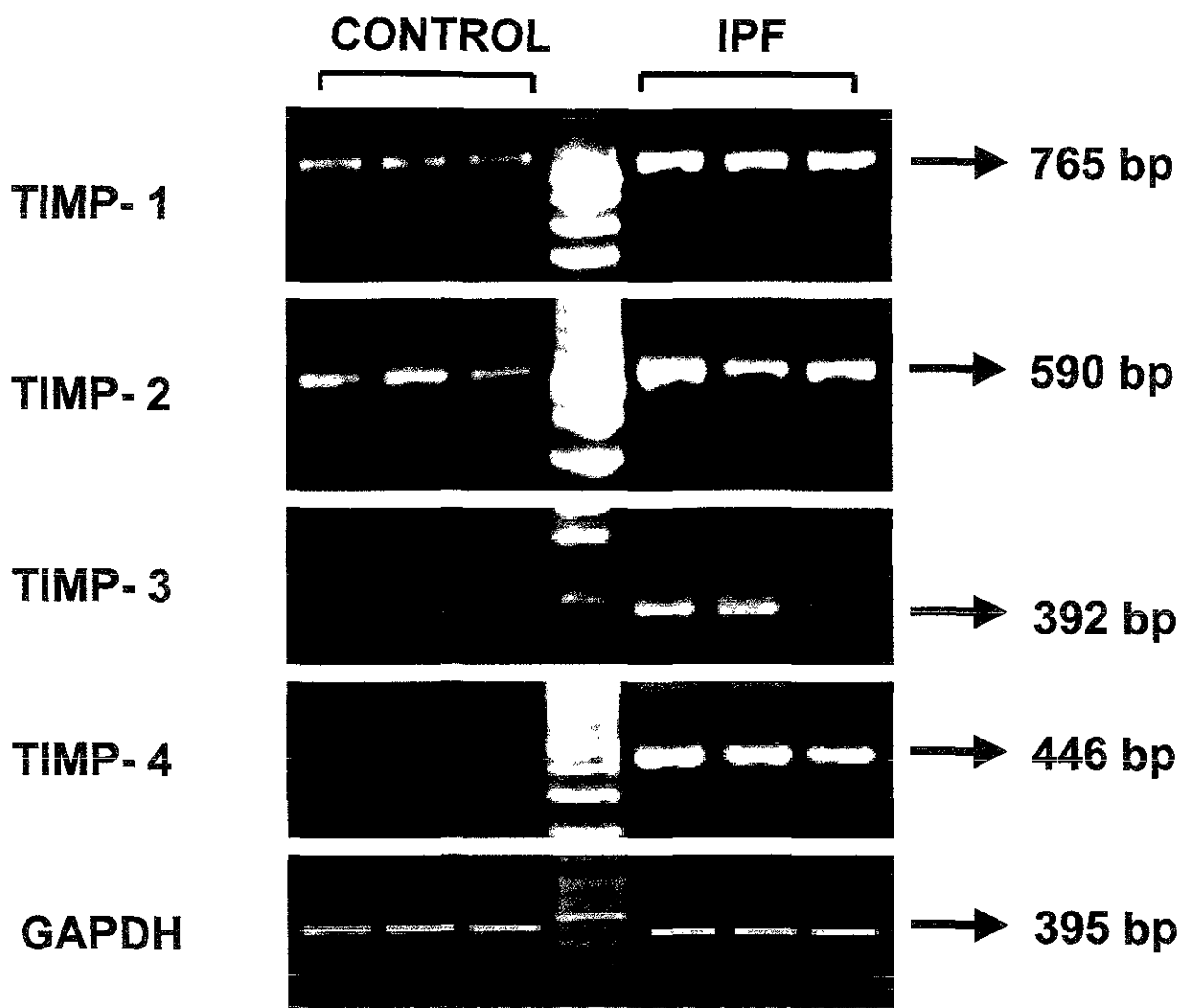
**Figura 5.** Detección de apoptosis espontánea en cultivos primarios de fibroblastos pulmonares con Yoduro de Propidio (PI) mediante microscopía fluorescente. **A:** núcleos normales en un cultivo de fibroblastos control. **B:** núcleos normales y fragmentados (cabeza de flecha) conteniendo cromatina condensada, indicativo de la presencia de apoptosis en fibroblastos derivados de IPF. **C:** cuantificación de fibroblastos apoptóticos con el ensayo de tinción con PI; los núcleos fragmentados fueron cuantificados como % del total. Los datos representan la media  $\pm$  d.e. del porcentaje de núcleos fragmentados en tres cultivos normales y tres derivados de IPF;  $p < 0.01$ .



**Figura 6.** Evaluación de la inmunorreactividad con el anticuerpo monoclonal contra  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en cultivos primarios de fibroblastos derivados de pulmón humano: en relación con el contenido de DNA y analizado mediante citometría de flujo (A' y B'); examinación por medio de tinción inmunocitoquímica y microscopía florescente (A, B y C). Se muestra un ejemplo de: A' fibroblastos derivados de un paciente con IPF; B' fibroblastos derivados de un pulmón control; A fibroblastos derivados de un paciente con IPF; B fibroblastos derivados de un pulmón control; C un control negativo omitiendo el anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -SMA.



**Figura 7.** Expresión del mRNA de colágena  $\alpha 1$  [I], TGF $\beta$ 1, colagenasa-1 (MMP-1), gelatinasas A y B, y GAPDH en tres cultivos primarios de fibroblastos control y tres fibroblastos derivados de pacientes con IPF utilizando la metodología de la RT-PCR (análisis semi-cuantitativo, ver métodos). El RNA total fue extraído y sujeto a amplificación utilizando los primers específicos indicados en la tabla 1. Los productos del PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa y visualizados con tinción de bromuro de etidio, y con el análisis densitométrico de las bandas.



**Figura 8.** Expresión del mRNA de TIMP-1, -2, -3 y -4 y GAPDH en tres cultivos primarios de fibroblastos control y tres fibroblastos derivados de pacientes con IFP. Mediante el uso de la metodología de la RT-PCR (análisis semi-cuantitativo, ver métodos). El RNA total fue extraído y sujeto a amplificación utilizando los primers específicos indicados en la tabla 1. Los productos del PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa y visualizados con tinción de bromuro de etidio y análisis densitométrico.

## DISCUSIÓN

La IPF es un padecimiento pulmonar progresivo y generalmente mortal, caracterizado por la presencia de pequeños agregados de fibroblastos ampliamente distribuidos por todo el parénquima, y presumiblemente provocados por la presencia de múltiples microfocos de daño epitelial, acompañado del remodelamiento anormal de la arquitectura pulmonar (2, 5, 55).

Recientemente, diversas evidencias han demostrado la existencia de una heterogeneidad funcional y fenotípica entre los fibroblastos tisulares, esto es, la existencia de diferentes subpoblaciones de fibroblastos. Entre estas destacan las de miofibroblastos, que expresan características fenotípicas de fibroblastos y células musculares lisas, y que se encuentran comúnmente incrementados tanto en la fibrosis pulmonar idiopática humana como en diversos modelos de fibrosis pulmonar experimental (5, 55).

Cuando se examinó mediante citometría de flujo (FACS) e inmunocitoquímica, en todos los cultivos primarios de fibroblastos pulmonares, tanto controles como derivados de IPF expresaron  $\alpha$ -SMA. Además, encontramos que los fibroblastos derivados de pulmones con IPF mostraron un marcado incremento en el porcentaje de miofibroblastos respecto a los controles, lo cual correlaciona con las observaciones desarrolladas *in vivo* (11-14). Aunque el origen celular de los miofibroblastos pulmonares se desconoce, se consideran precursores potenciales al fibroblasto intersticial y la célula de músculo liso que se ubica en las puntas septales del ducto alveolar (63). El incremento de miofibroblastos en los múltiples focos de fibroblastos observados en la IPF puede tener diversas consecuencias nocivas, que contribuyen a la contracción activa del parénquima, el decremento de la distensibilidad pulmonar y la distorsión de

la arquitectura pulmonar (5). En realidad, los miofibroblastos desempeñan una participación crítica en la cicatrización, debido a que estas células expresan altos niveles de  $\alpha$ -SMA, se adhieren fuertemente a la matriz extracelular, y se organizan constituyendo haces celulares contráctiles, cuando las células se ubican a lo largo de su eje para facilitar así la contracción tisular, y reducir el área superficial en el tejido dañado (64). En adición a todo esto, los miofibroblastos producen factores apoptóticos para las células alveolares *in vitro*, tal es el caso de la angiotensinógeno y angiotensina II (14), que han sido además localizadas en áreas adyacentes a las de epitelio alveolar desnudado *in vivo* (12, 16). Por otra parte, se ha sugerido que los miofibroblastos pueden ser los principales responsables del incremento en la expresión de los genes de colágena en la IPF (55). A pesar de esto, tal observación no ha sido documentada *in vitro*. Raghu y cols. (52) encontraron que los fibroblastos de los pulmones normales y fibróticos sintetizan cantidades similares de colágena, aún cuando fueran estimulados con TGF $\beta$ 1. En este estudio, los cultivos primarios de fibroblastos/miofibroblastos derivados de pulmones con IPF, presentaron niveles más altos del mRNA de colágena I, y con mayor % de síntesis al compararlos con los fibroblastos derivados de pulmón normal.

Por otra parte los fibroblastos derivados de IPF mostraron un marcado decremento en la tasa de crecimiento al compararlos con los fibroblastos derivados de sujetos normales, diferencia que se observó a desde el día 4 hasta el 13. Estos resultados difieren de los reportados previamente por Jordana y cols. (10) quienes mostraron que los fibroblastos primarios derivados de pacientes con IPF proliferan más rápido que los derivados de pulmones control. Sin embargo, Raghu y cols. (52) quienes obtuvieron fibroblastos del mismo pulmón fibrótico, encontraron un rango más alto de proliferación en células derivadas de áreas inflamadas, y la más baja en los



fibroblastos de áreas con cicatriz fibrótica densa. Dada la nueva clasificación histológica de la IPF (4), habría que considerar la posibilidad de que en aquellos estudios los fibroblastos derivados de IPF hubieran sido obtenidos de casos con diagnóstico de neumonía intersticial usual (UIP) (9).

Estos resultados son el producto de observaciones repetidas por años en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), que hasta ahora no habían sido publicadas. Usualmente, los cultivos primarios derivados de IPF han sido muy difíciles de establecer y crecer *in vitro*, y exhiben un número limitado de duplicaciones. La reducida tasa de crecimiento de los fibroblastos derivados de IPF puede tener diferentes explicaciones. Así por ejemplo, se ha mostrado que la diferenciación de los miofibroblastos pulmonares de rata *in vitro* presentan una actividad reducida de las telomerasas (65). El decremento en la expresión de esta enzima puede determinar una capacidad proliferativa reducida, además, hemos demostrado previamente que los miofibroblastos separados por sedimentación en gradientes de ficol en condiciones atmosféricas estándar, son usualmente de mayor tamaño y proliferan marcadamente más lento que los fibroblastos de tamaño menor (13).

Coincidentalmente, en este estudio también observamos que las células positivas para  $\alpha$ -SMA son de mayor diámetro que las células negativas para  $\alpha$ -SMA; independiente de que fueran derivadas de pacientes con IPF o de pulmones control. Adicionalmente, la tasa de crecimiento más baja puede ser explicada por un incremento en la muerte celular programada o apoptosis. Nuestros hallazgos apoyan esta hipótesis, ya que los fibroblastos derivados de IPF mostraron un porcentaje mucho mayor de células con apoptosis espontánea en relación con las células normales. En estudios con fibroblastos derivados de pulmón humano normal, Alkamine y cols. (49), han identificado dos subpoblaciones, las cuales fueron aisladas

con base en la expresión diferencial del receptor para C1q. Uno de los primeros componentes del complemento. Los fibroblastos separadas por C1q, mostraron dos morfologías distintas: células en forma de huso con proyecciones alargadas (y alta adherencia), o células grandes y más aplanadas (49). Los subgrupos también fueron diferentes en la tasa de proliferación y especialmente en la capacidad para la sintetizar colágena, tanto en condiciones basales como después de la inhibición por interferón- $\gamma$  o con estimulación por TGF- $\beta$ 1. Más interesante en el contexto de nuestros hallazgos, en otro artículo se reportó la presencia de una subpoblación de fibroblastos humanos con baja afinidad C1q, que mostró tasa de crecimiento muy baja, a pesar de contener un alto porcentaje de células en la fase S del ciclo celular (49).

Esta paradoja puede ser explicada por un alto rango de apoptosis en esta población, la cual muestra la misma morfología de células grandes y aplanadas, tal como se describió en una subpoblación de fibroblastos pulmonares identificados en un trabajo desarrollado en el INER (13).

En este trabajo se mostró que los fibroblastos aislados de IPF contienen una proporción mayor de miofibroblastos, que exhiben capacidad proliferativa disminuida y presentan un incremento en la proporción de células con apoptosis espontánea. Diversas citocinas podrían participar en la inducción de esta apoptosis, incluyendo interleucina-1 $\beta$ , la cual se ha reportado que induce apoptosis además de inhibición en la proliferación de linfocitos T (66). Además, la apoptosis basal incrementada podría estar relacionada con la producción de péptidos de angiotensina II por parte de los miofibroblastos, que inducen apoptosis en diferentes tipos celulares, incluyendo células del epitelio alveolar (47,66). En cuanto al análisis de las moléculas analizadas en este estudio, aunque primariamente se han relacionado con la remodelación de la matriz extracelular, algunas de ellas

también contribuyen al incremento de la apoptosis. Particularmente, la sobreexpresión del TIMP-3, el cual induce muerte celular programada en diversos tipos de células (67). La determinación de cuales de estos factores participa en la inducción de la apoptosis de los fibroblastos, y cuales son los fenotipos requeridos dentro de los fibroblastos pulmonares aislados son los que entran en apoptosis, será un interesante tema para futuros experimentos.

El resultado final de la IPF es una desorganización estructural extensa del parénquima pulmonar, con la subsecuente pérdida progresiva de las unidades alveolo-capilares. El mecanismo molecular que participa detrás de este remodelamiento tisular errático que produce como resultante una acumulación exagerada de matriz extracelular no ha sido elucidado, pero podría involucrar una pérdida en el balance altamente regulado entre las MMP y los TIMPs (56,57). En este contexto, no se encontraron diferencias en la expresión del gene de colagenasa-1, lo cual corrobora hallazgos previos respecto a los niveles de la proteína de MMP-1 en fibroblastos derivados de IPF y controles (9). En relación con las gelatinasas, se ha demostrado que la MMP-2 se expresa de manera constitutiva en fibroblastos pulmonares y en este estudio no encontramos diferencias entre las células derivadas de IPF y las de los controles. Sin embargo, los fibroblastos derivados de pulmón normal usualmente no expresan MMP-9 *in vitro*, pero en el caso de los fibroblastos derivados de IPF encontramos que expresan el transcrito de MMP-9. La cual ha sido encontrado en otros estudios analizando mediante inmunocitoquímica en pulmones fibróticos (57). La expresión de la gelatinasa B puede representar una participación importante en la ruptura de las membranas basales y la migración de los fibroblastos hacia los espacios alveolares.

La expresión de los genes para los cuatro TIMPs se encontró en los fibroblastos de pulmones derivados de pulmones con IPF. Aunque los

TIMPs se unen fuertemente a la mayoría de las MMPs, exhiben diferencias en sus propiedades inhibitorias, patrones de expresión, y otras propiedades tales como su asociación con las MMPs latentes, actividad promotora del crecimiento celular, promoción de la actividad de supervivencia y apoptosis (36,67). En este contexto, la sobre-expresión de los TIMPs podría ser considerada como una contribución a los mecanismos de regulación en el mantenimiento de un microambiente fibrótico, ya que son responsables de la inhibición de la actividad de las metaloproteinasas de la matriz; y por consiguiente de la degradación de matriz extracelular. Apoyando este punto de vista, recientemente se ha encontrado que los pulmones derivados de IPF presentan niveles intersticiales significativamente más altos de TIMPs que de colagenasas (57). Por otra parte, debido a que los TIMPs pueden participar tanto en la inducción de apoptosis como en su inhibición, el incremento de la expresión de los TIMPs puede también contribuir al desarrollo del proceso patológico observado en los pulmones con IPF, por incremento de la proliferación de algunas poblaciones celulares o induciendo la muerte de otras. En este contexto, es interesante enfatizar que el TIMP-2 es expresado casi exclusivamente por fibroblastos clásicos y miofibroblastos en los focos de fibroblastos característicos de los sitios de *daño alveolar epitelial y asociado a la activación del proceso que desarrolla fibrosis tisular* (57,68). La expresión del TIMP-2 por fibroblastos puede estar asociada con el efecto inhibitorio de colagenasas, pero también con la activación de la gelatinasa A latente y la estimulación de la proliferación de fibroblastos. El TIMP-3 es muy diferente debido a que se une fuertemente a componentes insolubles de la matriz extracelular, principalmente al heparán sulfato, el cual posee propiedades antiadhesivas para los fibroblastos, y en este contexto la sobre-expresión del TIMP-3 puede inducir apoptosis (67). De manera interesante, se ha reportado los niveles del mRNA para TIMP-3

son altos en diversos cultivos de esclerosis sistémica (69). Los estudios sobre TIMP-4 son escasos y sus actividades funcionales y aspectos de su inhibición sobre MMPs, son esencialmente desconocidos. Evidencias recientes han demostrado una relación temporal entre la sobre-expresión del TIMP-4 y el inicio del depósito de colágena en las paredes arteriales dañadas, sugiriendo una participación importante en el balance proteolítico de la vasculatura (70).

Ciertamente, otros tipos de células relacionadas con los fibroblastos/miofibroblastos pueden desempeñar un papel importante en el desbalance proteasas-antiproteasas durante la patogenia de la IPF. Así, las células residentes, como por ejemplo las células del epitelio alveolar, las células endoteliales, y las células derivadas de la respuesta inmune, son capaces de producir diferentes MMPs y TIMPs *in vivo*. Particularmente: MMP-1, MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 han sido detectados en las células epiteliales en la cercanía a los focos de fibroblastos. La MMP-1 se ha observado también en los macrófagos alveolares, la MMP-9 en neutrófilos, los TIMP-1 y TIMP-3 en macrófagos intersticiales, y el TIMP-4 en células plasmáticas (57,68,70). Por consiguiente, durante el desarrollo del remodelamiento de la matriz extracelular en IPF existe una regulación muy compleja debida a una relación en la que participan células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, células inflamatorias, y la propia matriz extracelular del microambiente pulmonar.

En resumen, aunque el número de cultivos de fibroblastos analizados en este estudio fue pequeño, los hallazgos *in vitro* se correlacionan con observaciones previas *in vivo* y sugieren que los fibroblastos/mifibroblastos derivados de pulmones con IPF exhiben un fenotipo secretor profibrótico, con baja tasa de crecimiento y con apoptosis espontánea incrementada.

## **CONCLUSIONES.**

El análisis comparativo de los cultivos primarios de fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF), mostró las siguientes diferencias con los obtenidos de pulmones control:

- 1. Tasa de crecimiento más baja, tanto con 1 como con 10 % de FBS.**
- 2. Porcentaje más alto de células con apoptosis espontánea.**
- 3. Mayor proporción (%) de fibroblastos positivos para  $\alpha$ -actina de músculo liso.**
- 4. Mayor expresión de los mRNA para colágena  $\alpha 1$ -[I], factor transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ 1), gelatinasa B (MMP-9) y los TIMPs 1, 2, 3 y 4.**

Por otra parte se encontraron las siguientes semejanzas en los fibroblastos derivados de IPF en relación con los controles:

- 5. Expresión similar de los mRNAs para colagenasa intersticial - 1 (MMP-1) y gelatinasa A (MMP-2).**
- 6. Mayor tamaño de las células positivas con la inmunotinción para  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), en relación con las células negativas.**

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Selman M. Neumopatías intersticiales difusas, Editorial Médica Panamericana, México 1996: 11-33
2. Selman M, King T, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: progress in understanding its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* 2001;134: 136-151
3. Selman M, Pardo A. Pathogenic mechanism in the development of diffuse pulmonary fibrosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996; 29 (9): 1117-1126
4. Katzenstein ALA, and Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1998; 157:1301-1315
5. Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am. J. Pathol.* 1991;138:1257-1265
6. Montaña M, Ramos C, González G, Vadillo F, Pardo A, and Selman M. Lung collagenase inhibitors and spontaneous and latent collagenase activity in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis, *Chest* 1989; 96: 1115-1119
7. Selman M, Montaña M, Ramos C, Chapela R. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1986; 41:355-359
8. Pardo A, Selman M. Matriz metalloproteinases in the pathogenesis of lung injury. In: collagenases, Hoeffler W, ed. RG Landes Co. Georgetown TX, USA. 1999; 102: 1089-1992
9. Pardo A, Selman M, Ramírez R, Ramos C, Montaña M, Stricklin G, and Raghu G. Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs. *Chest* 1992; 102: 1085-1089

10. Jordana M, Schulman J, McSharry C, Irving LB, Newhouse MT, Jordana G, Gauldie J. Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic Tissue. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988;137: 579- 584
11. Zhang H-Y, Gharaee-Kermani M, Zhang K, Karmioli S, Phan SH. Lung Fibroblast  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression and Contractile Phenotype in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1996; 149: 527-537
12. Uhal BD, Joshi I, Hughes W F, Ramos C, Pardo A, and Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to  $\alpha$ -smooth muscle myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol. 19)* 1998; 275:L1192-L1199.
13. Uhal BD, Ramos C, Joshi I, Bifero A, Pardo A, Selman M. Cell size, cell cycle and  $\alpha$ -smooth muscle actin expression by primary human lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol. 19)*: 1998; 275: L998-L1005
14. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, and Uhal BD. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol. 21)* 1999; 277: L1158-L1164
15. Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis-an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell. Tissue. Res.* 1998; 292: 447-452
16. Basset F, Ferrans VJ, Takemura T, Fukuda Y, Crysral RG. Intraluminal fibrosis in interstitial lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol. 13)* 1995;269: 819-828
17. Fukuda Y, Ishizaki Y, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am. J. Pathol.* 1987;126:171-182
18. Turino GM. The lung parenchyma. A dynamic matrix. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985; 132: 1324-1334



19. Rapraeger A, Koda JE, Bernfield M. Matrix interactions of cell surface proteoglycans. In *Biochemistry of extracellular matrix*. Uitto J. and Prejda AJ. Eds. Marcel Dekker, Inc, New York, 1989: 213-231
20. Dunsmore SE, and Rannels DE. Extracellular matrix biology in the lung. *Am. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol. )* 1996; 270: L3 - L27
21. Yurchenco PD, and Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 1990; 4: 1577-1590
22. Ayad S, Boot-Handford R, Humphries MJ, Kadle KE, Shuttleworth A. The extracellular matrix. *FactsBook*. 2a. ed. Academic Press, San Diego, Cal. 1998: 11
23. Brown JC, and Timpl R. The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995;107:484-490
24. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, and Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (part 1). *N. Engl. J. Med.* 1982; 301: 13-21
25. Burgeson RE. New collagens, new concepts. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1988; 4: 551-577
26. Weibel ER, and Crystal RG. Structural organization of the pulmonary interstitium. En: Crystal, R.G., J.B. West, et al. (eds.). *The Lung: Scientific Foundations*. Raven Press, Ltd., New York. 1991; 369-380
26. Willenbrock F, and Murphy G. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1994; 150: 165-170
27. Murphy G, and Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992; 7: 120-125
29. Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7: 728-738
30. Cox G, Steward WP, and O'Byrne KJ. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax* 1999; 54: 169-179

31. Woessner JF, The family of matrix metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994; 732: 11-2
32. Uria JA, Lopez-Otin C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res.* 2000; 60: 4745-51
33. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, and Welgus HG. Human 92-and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 7870-7875
34. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays.* 1992; 14(7): 455-463.
35. Postlethwaite A, Kang AH. Fibroblasts and Matrix Proteins. In: *Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates. Second Edition.* Edited by JI Gallin, IM Goldstein and R. Snyderman. Raven Press, Ltd., New York, 1992: 747-773278.
36. Gómez D, Alonso D, Yoshiji U, and Thorgeirsson UP. Tissue Inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 1997; 74: 111-122.
37. Baker AG, Sarah AB, George SJ, Newby AC. Divergent effect of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3. Overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. *J. Clin. Invest.* 1998; 101 (6): 1478-1487
38. Guedez L, Stedler-Stevenson W, Wolff L, Wang J, Fukushima et al. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J. Clin. Invest.* 1998; 102 (11): 2002-2010
39. Alexander CM, Howard, Bissel MJ, Werb Z. Cell Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and degradation by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 transgene. *J. Cell Biol.* 1996; 135(6 pte. 1): 1669-1677
40. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DWC, and McManus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Invest.* 1998; 78 (8): 893-913

41. Majno G, and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995; 146(1): 3-15
42. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol.* 1997; 25(1): 82-88
43. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière J-L, and Mignote B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 1995; 9:1277-1287
44. Ashkenazi A, and Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 81: 1305-1308
45. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, and Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3227-3245
46. Kuwano K, Miyazaki M, Haginomoto N, Kawazaki M, Fujit m, Kunitake R, Kaneko and Hara N. The involvement of Fas-Fas ligand pathway in fibrosing lung diseases. *Am. J. Respir. Cel. Mol. Biol.* 1999; 20: 53-60
47. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya I, Pardo A, Celan N, and Uhal BD. Human lung myfibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *AM. J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.* 19) 1998; 275: L1192-L1199
48. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, and Phipps RP. Evidence of Fibroblast Heterogeneity and Role of Subpopulations in Fibrosis. *Clinical Immunol. Immunopathol.* 1994; 72: 283-292
49. Akamine A, Raghu G, Narayanan S. Human Lung Subpopulations with Different C1q Binding and Functional Properties. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992; 6: 382-389
50. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, and Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cels. *Synthesis of chemokines and regulation of immflamation.* *Am. J. Pathol.* 1997; 151 (2): 317-322
51. Phipps RP. Pulmonary Fibroblast Heterogeneity. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992.

52. Raghu G, Chen YY, Rusch V, Rabinovitch PS. Differential proliferation of fibroblasts cultured from normal and fibrotic human Lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 138: 703-708
53. Raghu G, Masta S, Meyers D, Narayanan AS. Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor- $\beta$ . *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 140:95-100
54. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol.* 1999; 277:C1-C19
55. Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1994; 145:114-125
56. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, and Travis WD. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1996; 149:1241-1256.
57. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, and Pardo A. TIMP 1, 2, 3 and 4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? *Am. J. Physiol.* 2000; 279:L562-L574
58. Becerril C, Pardo A, Montaña M, Ramos C, Ramírez R, and Celan M. Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Molec. Biol.* 1999; 20:1020-1027
59. Gorczyca W, Gong J, and Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Res.* 1993; 53: 1945-1951
60. Uhal BD, and Rannels DE. DNA distribution analysis of Type II pneumocyte by laser flow cytometry: technical considerations. *Am. J. Physiol.* 1991; 261: L296-L306

61. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 1993; 15: 532-535
62. Sime P, Xing Z, Graham LF, Csaky KG, and Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- $\beta$ 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 768-776
63. Leslie KO, Mitchell J, and Low R. Lung Myofibroblasts. *Cell Motil. Cytoeskeleton.* 1992; 22: 92-98
64. Racine-Samson L, Rockey DC, and Bissell DM. The role of alpha 1 beta 1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:30911-30917
65. Nozaky Y, and Phan S. Rat lung myofibroblast differentiation results in reduced telomerase activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 159: A929
66. Zhang HY, Gharaee-Kermani M, and Phan SH. Regulation of lung fibroblast  $\alpha$ -smooth muscle actin expression, contractile phenotype, and apoptosis by IL-1 $\beta$ . *J. Immunol.* 1997; 158:1392-1399
67. Brew K, Dinakarandian D, and Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1477:267-283
68. Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, and Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab. Invest.* 1998; 78:687-698
69. Mattila L, Airola K, Ahonen M, Hietarinta M, Black C, Saarialho-Kere U, and Kahari VM. Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 110:416-421
70. Dollery CM, McEwan JR, Wang M, Sang QA, Liu YE, and Shi YE. TIMP-4 is regulated by vascular injury in rats. *Circ. Res.* 1999; 84:498-504