

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A
HUMO DE TABACO SOBRE LA LESIÓN
FIBROSANTE PULMONAR INDUCIDA
CON BLEOMICINA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO SEMO

MÉXICO, D.F.



COORDINACIÓN

ENERO, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: José Guadalupe Cisneros Lira

FECHA: 16-ENERO-2004

FIRMA:

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de noviembre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) José Guadalupe Cisneros Lira, con número de cuenta 87275722 y número de expediente 3981032, con la tesis titulada: "Efecto de la exposición crónica a humo de tabaco sobre la lesión fibrosante pulmonar inducida con bleomicina", bajo la dirección del (la) Dra. Annie Pardo Semo.

Presidente:	Dra. Teresa Fortoul van der Goes
Vocal:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Vocal:	Dr. Moisés Eduardo Selman Lama
Vocal:	Dra. Vilma Maldonado Lagunas
Secretario:	Dra. Annie Pardo Semo
Suplente:	Dr. Felipe Vadillo Ortega
Suplente:	Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de diciembre de 2003

Dr. Juan J. Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

El Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT. Agradezco la beca otorgada durante el desarrollo de este trabajo. Así mismo agradezco el apoyo brindado por la DGEP.

Este trabajo contó con el apoyo del PAEP clave 101305 y fue parte del proyecto financiado por PAPIIT, clave IN210999.

A mi estrellita

DANIELA

Tu luz siempre iluminara mi vida.

Agradecimientos

A mis maestros: Dra. Annie Pardo y Dr. Moisés Selman, por todo el apoyo brindado, por su confianza y por brindarme la oportunidad de ser cómplice de sus conocimientos.

A los miembros del comité tutorial, por sus acertados comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo: Dra. Annie Pardo, Dr. Moisés Selman y Dr. Felipe Vadillo.

Al resto de los miembros del jurado quienes desinteresadamente aceptaron revisar este trabajo: Dra. Teresa Fortoul, Dr. Luis Felipe Jiménez, Dra. Lourdes Segura y Dra. Vilma Maldonado.

A mis compañeros del INER, la Facultad de Ciencias y la UAM, por su amistad, su apoyo y por todo lo que compartimos a lo largo de estos años: Carlos Ramos, Martha Montaña, Carina Becerril, Víctor Ruíz, Ignacio Páramo, Carmen Navarro, Rocío Rojas, Jorge García, Remedios Ramírez y Julia Pérez.

En especial a mis amigos: Carlos, Martha, Víctor, Carina y Julia. Mil gracias por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

A Daria y a los integrantes de la familia Razo (Don Guillermo, Doña Victoria, Raúl, Raymundo, Ana, Memo, Landy y Elsa) por sus muestras de apoyo durante todo el tiempo que convivimos juntos.

A mis padres y hermanos, por todo lo que me han dado y porque siempre confiaron en mí.

A quienes me brindaron su confianza y su amistad: Vero, Guadalupe, Juan y Miguel Laboy.

Un agradecimiento muy especial a Iliana, por darme la oportunidad de creer nuevamente en mí y por todo lo maravilloso que hemos compartido.

Gracias Peke.

A todos aquellos cuya ayuda fue indispensable para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Pag.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
Pulmón y matriz extracelular	3
Metaloproteinasas de matriz extracelular y sus inhibidores tisulares.....	5
Fibrosis pulmonar.....	10
Humo de cigarro y fibrosis pulmonar.....	13
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	16
MATERIAL Y MÉTODOS	
Animales.....	17
Exposición a humo de tabaco.....	17
Tratamiento con bleomicina.....	17
Modelo experimental.....	18
Análisis morfológico.....	18
Medición de hidroxiprolina.....	19
Lavados broncoalveolares (LBA).....	19
Proliferación de fibroblastos.....	20
Cuantificación de IL-4 y TIMP-2.....	21
Análisis por inmunohistoquímica.....	21
Análisis de α -actina de músculo liso	22
Zimografía.....	23
Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS	
Morfología.....	25
α -actina de músculo liso.....	25
Hidroxiprolina.....	27
Perfil celular en LBA.....	29
Proliferación de fibroblastos.....	30
ELISA de IL-4 y TIMP-2 en LBA.....	31
Inmunolocalización de IL-4 y TIMP-2.....	33
Zimografía de extractos de tejidos.....	35
DISCUSIÓN y CONCLUSIÓN	37
REFERENCIAS	43
APÉNDICES	56

RESUMEN.

ANTECEDENTES: La fibrosis pulmonar es el resultado final común de diversos padecimientos crónicos y agudos que afectan al pulmón. Las características fundamentales que describen a la fibrosis pulmonar son: la proliferación excesiva y activación de fibroblastos y el depósito exagerado de matriz extracelular en el intersticio del pulmón, particularmente de colágenas. La relación entre el hábito de fumar y la fibrosis pulmonar no se ha estudiado con profundidad. Se ha sugerido que fumar puede proteger de ciertos padecimientos fibrosantes pulmonares (sarcoidosis, radiaciones, neumonitis por hipersensibilidad) pero puede ser un factor de riesgo para otros como por ejemplo la fibrosis pulmonar idiopática. Sin embargo, los trabajos que han tratado de determinar las consecuencias de fumar en la patogénesis y la progresión de la fibrosis pulmonar son escasos y los resultados que hasta ahora se han generado en este sentido son contradictorios.

OBJETIVO: Investigar los efectos del humo de tabaco en el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en cobayos.

MATERIAL Y METODOS: Se estudiaron 5 grupos de cobayos: 1) controles (C); 2) instilados por vía intratraqueal con bleomicina (B); 3) expuestos a humo de tabaco durante 6 semanas (HT); 4) instilados con bleomicina y expuestos a humo de tabaco simultáneamente durante 6 semanas (B+HT) y 5) expuestos a humo de tabaco 6 semanas y posteriormente tratados con bleomicina (HT/B). Se realizó un análisis histológico para determinar el grado y el tipo de las lesiones pulmonares, se determinó el contenido de hidroxiprolina pulmonar como marcador de colágena y se realizó un análisis semicuantitativo de células positivas a α -actina de músculo liso. Adicionalmente, se hicieron lavados broncoalveolares (LBA) y en estos se examinó el perfil inflamatorio (conteo diferencial de células) y se analizaron los niveles de

interleucina-4 (IL-4), metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9 y el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP)-2. Asimismo, se analizó la tasa de crecimiento de fibroblastos pulmonares normales estimulados con sobrenadante de los LBA.

RESULTADOS: Los 3 grupos de animales que recibieron bleomicina desarrollaron diferentes grados de fibrosis pulmonar, lo que no se observó en cobayos expuestos al humo del cigarrillo ni controles instilados con solución salina. En comparación con los cobayos que recibieron solamente bleomicina, aquellos que fueron tratados con bleomicina y humo de tabaco (grupos B+HT y HT/B) desarrollaron lesiones fibróticas más severas, incluyendo un incremento significativo en el número de células positivas a α -actina (identificadas como miofibroblastos): B+HT: $3.3 \pm 0.61\%$; HT/B: $3.7 \pm 0.28\%$; B: $2.2 \pm 0.64\%$; $p < 0.05$. Sin embargo, solo los animales que primero fueron expuestos a humo de tabaco y después instilados con bleomicina (HT/B) mostraron un incremento significativo en el contenido de colágena pulmonar comparados con el grupo de bleomicina sola (HT/B: 3.5 ± 0.7 ; B+HT: 2.9 ± 0.4 ; B: 2.4 ± 0.2 mg de hidroxiprolina/pulmón; $p < 0.01$). En los lavados broncoalveolares del grupo HT/B se observó un incremento significativo en el número de eosinófilos, en la actividad de MMP-2 y MMP-9 y en los niveles de IL-4 y TIMP-2 ($p < 0.01$ para todas las comparaciones). Asimismo, el LBA de estos cobayos indujo un incremento significativo en la proliferación de fibroblastos *in vitro* ($p < 0.05$). De manera interesante, la exposición a humo de tabaco por sí sola provocó un incremento en la actividad de MMP-9 de los LBA, así como en la capacidad proliferativa de fibroblastos.

CONCLUSIÓN: Los resultados de este estudio sugieren que la exposición a humo de tabaco contribuye a formar un microambiente profibrótico que puede contribuir a incrementar la respuesta fibrótica inducida por bleomicina.

INTRODUCCIÓN.

Pulmón y matriz extracelular.

La función primordial del pulmón es la oxigenación de la sangre y el desecho de CO₂. Este proceso se lleva a cabo en los alvéolos pulmonares cuyo epitelio está formado por neumocitos tipo I y los tipo II (1). Sin embargo, las características morfológicas y funcionales del pulmón dependen en gran medida de la estructura y composición de su matriz extracelular (MEC).

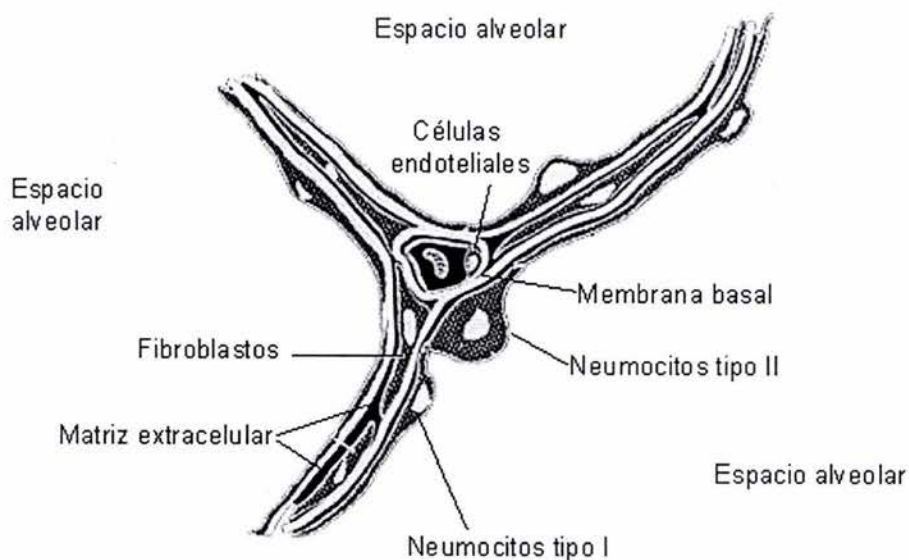
La MEC se encuentra fuera de las células y está formada por una compleja red de proteínas y carbohidratos cuyo arreglo específico define la histoarquitectura de cada órgano. Además de su papel estructural como soporte de células, la MEC participa en procesos de diferenciación, proliferación, migración, adhesión y apoptosis de diferentes tipos celulares y puede funcionar como un reservorio en donde se almacenan moléculas con propiedades mitogénicas y apoptóticas (2-4).

Las colágenas son las proteínas más abundantes de la MEC y en el pulmón representan el 20% del peso seco del órgano (5). Se han descrito más de 20 tipos diferentes de colágenas, cuya característica común es que están formadas por tres cadenas polipeptídicas denominadas alfa (α) que se entrelazan y forman una estructura de triple hélice. Cada una de las cadenas α presenta cuando menos un dominio colagénico, en cuya secuencia de aminoácidos la glicina ocupa siempre la tercera posición en secuencias repetidas (Gly-X-Y)_n y cerca del 20% de los residuos en posición X y Y están ocupados por prolina e hidroxiprolina, respectivamente (4, 6, 7).

La MEC del pulmón está formada en su mayor parte por moléculas de colágena y elastina que se agrupan formando fibras. Además, existen una gran variedad de moléculas de fibronectina, laminina, proteoglicanos y glicoproteínas. En el intersticio pulmonar el 75% de las moléculas

son colágenas fibrilares tipos I y III. Embebidas en esta matriz se encuentran varios tipos de células mesenquimatosas incluyendo fibroblastos, miofibroblastos y pericitos (1, 5).

Las membranas basales son un tipo especializado de MEC y en el pulmón se encuentran a lo largo de las vías aéreas, el epitelio alveolar y el endotelio vascular. En los sitios de contacto entre los neumocitos tipo I y las células endoteliales, las membranas basales se fusionan para facilitar el intercambio gaseoso. El principal componente de las membranas basales es la colágena tipo IV y junto con ella coexisten diversas moléculas de laminina, fibronectina, colágenas tipo XV y XVIII, nidógeno, fibulina, además de diversos proteoglicanos de heparan sulfato, distroglicano y otras glicoproteínas (8).



Esquema de la organización del intersticio pulmonar.

Metaloproteinasas de matriz extracelular y sus inhibidores tisulares.

Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP por sus siglas en ingles) son una familia de más de 20 endopeptidasas que contienen zinc en su sitio activo y que son capaces de degradar a las proteínas de matriz extracelular. Además tienen actividad sobre una gran variedad de sustratos que incluyen a otras proteasas, inhibidores de proteinasas, factores de coagulación, moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento, proteínas de unión de factores de crecimiento y moléculas de adhesión célula-célula y célula-MEC. Las MMP se sintetizan como pro-enzimas inactivas que se secretan o se encuentran ancladas a membrana y en algunos casos permanecen almacenadas en gránulos secretores de células inflamatorias como los neutrófilos. Su activación requiere de la remoción de un “propéptido” en el extremo amino-terminal y son activas a pH neutro, aunque para desarrollar completamente su actividad requieren de iones Ca^{2+} . La actividad de las MMP es inhibida por inhibidores tisulares de metaloproteinasas llamados TIMP por sus siglas en inglés (9, 10).

Estructuralmente, todas las MMP cuentan al menos con un pre-dominio, un dominio llamado propéptido y un dominio catalítico. El pre-dominio contiene la secuencia para la secreción de estas enzimas. El propéptido tiene de 80-90 residuos de aminoácidos y tiene un residuo de Cys que se encuentra dentro de una secuencia altamente conservada PRCXXPD. Por su parte, el dominio catalítico tiene un sitio activo con una secuencia conservada HEXXHXXGXXH en la cual se une el Zn^{2+} catalítico y también existen de 2-3 iones de Ca^{2+} y un ión adicional de Zn^{2+} estructural. La mayoría de las MMP poseen un dominio tipo hemopexina en el extremo carboxilo-terminal que tiene de 3-4 secuencias repetidas similares a hemopexina-vitronectina y se conecta al dominio catalítico mediante una región de longitud variable rica en prolina denominada bisagra. En algunas MMP, el dominio tipo hemopexina y la región de bisagra participan en el reconocimiento de la enzima por su sustrato y por sus inhibidores (11,12).

Basándose en la similitud estructural y la especificidad por los sustratos, las MMP se han clasificado en varios subgrupos que se describen a continuación (13, 14).

Colagenasas: Se han descrito 3 enzimas: la colagenasa intersticial (MMP-1) que se expresa en una gran variedad de células, incluyendo fibroblastos; la colagenasa de neutrófilos (MMP-8) y la colagenasa-3 (MMP-13). Estas enzimas presentan los dominios descritos anteriormente y degradan preferentemente colágenas fibrilares tipos I, II y III.

Gelatinasas: Pertenecen a este subgrupo la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9). A diferencia de otras MMP, las gelatinasas poseen un dominio adicional con 3 secuencias similares a fibronectina tipo II que se encuentra insertado en el dominio catalítico y que contribuye a la unión de la enzima con su sustrato. Adicionalmente, la gelatinasa B (MMP-9) tiene insertada una secuencia similar a colágena tipo V, lo cual la hace ser la de mayor peso molecular. Estas enzimas tienen una alta afinidad por colágena tipo IV y elastina, aunque también pueden degradar colágenas tipos V, IX, X y fibronectina. En el pulmón, la MMP-2 se expresa constitutivamente en diversos tipos celulares incluyendo fibroblastos, macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y neumocitos tipo II. Por su parte, la MMP-9 es secretada por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y neumocitos tipo II.

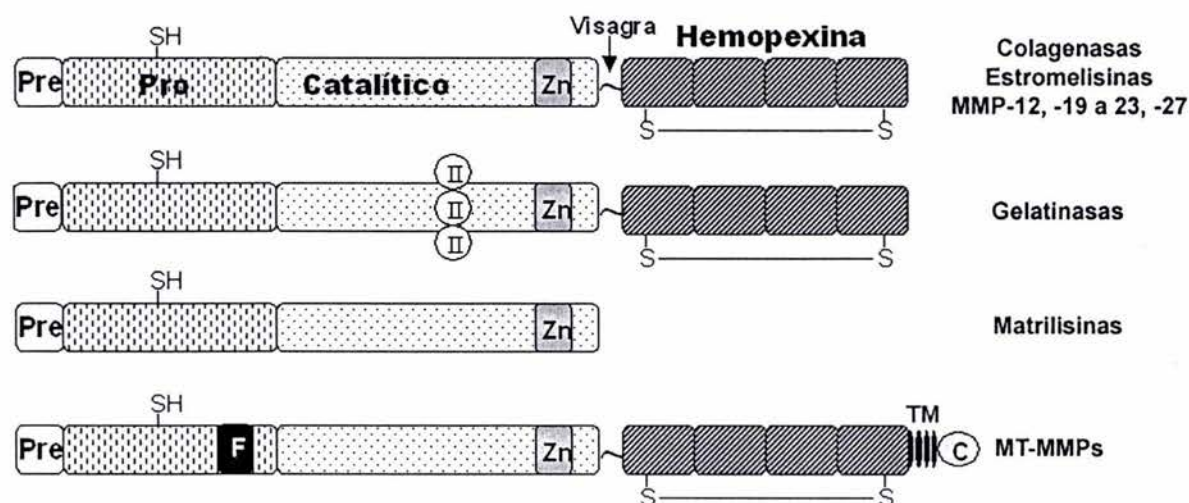
Estromelisininas: Las estromelisininas 1, 2 y 3 (MMP-3, MMP-10 y MMP-11, respectivamente) pueden degradar fibronectina, laminina, el núcleo proteico de proteoglicanos y colágena tipo IV en su región no triple helicoidal. Adicionalmente, la MMP-11 presenta una secuencia similar a furina (RXK/RR) entre el propéptido y el dominio catalítico, lo cual permite que la enzima se pueda activar intracelularmente por proteasas de serina, como la subtilisina.

MMPs tipo membrana (MT-MMP): Se han descrito 6 miembros: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP y MT6-MMP. Poseen un dominio transmembranal que ancla a la enzima en la superficie celular y todas tienen un motivo tipo furina el cual permite

que la proenzima se active intracelularmente. Además de degradar componentes de MEC como fibronectina y gelatina, las MT-MMP activan a otras MMP, como a la MMP-2. Recientemente se ha demostrado que la MT1-MMP posee la habilidad de degradar colágenas fibrilares (15).

Matrilisinas: Este subgrupo está formado por la matrilisina-1 (MMP-7) y la matrilisina-2 (MMP-26). Se caracterizan porque han perdido el dominio carboxilo-terminal y solo poseen los dominios propéptido y catalítico. Degradan a una amplia variedad de sustratos incluyendo fibrinógeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos y colágenas tipos III y IV.

Otras MMPs: Aquí se incluyen varias MMP con características muy particulares que no permiten asociarlas en los otros grupos y son: MMP-12, MMP-19, MMP-21, MMP-23, MMP-27 y MMP-28.



Esquema de la estructura de los dominios de las MMP. **Pre**, secuencia señal; **Pro**, propéptido con un grupo tiol (-SH) que se une al zinc; **Zn**, sitio de unión al zinc en el dominio catalítico; **II**, motivos similares a fibronectina tipo II; **F**, motivo tipo furina; **TM**, dominio transmembranal.

La expresión génica de estas enzimas se puede regular a través de citocinas, factores de crecimiento y contactos célula-MEC que desencadenan la activación de miembros de la familia de c-Fos y c-Jun que actúan sobre elementos de regulación transcripcional como AP-1. En algunas enzimas, como en la MMP-9, la expresión también se puede regular a través de PEA3, otro elemento de regulación al cual se unen miembros de los factores de transcripción de ETS (16). Adicionalmente, la MMP-9 posee sitios de regulación por NF- κ B y se ha observado que este elemento regula la sobreexpresión mediada por TGF- β y TNF- α en fibroblastos de piel (17).

La función de estas enzimas también se regula al nivel de activación de la pro-enzima. En el estado inactivo o de zimógeno, el residuo de Cys en el propéptido se encuentra unido al Zn²⁺ catalítico y para que la enzima funcione se requiere la ruptura de este enlace y la liberación del propéptido (11). Los activadores fisiológicos de este proceso denominado “switch de cisteína” no se conocen con precisión pero se sabe que la plasmina y la tripsina pueden activar a la MMP-1 (18). Se ha sugerido que la activación *in vivo* de las MMP involucra la participación de distintos miembros de la misma familia. Por ejemplo, la MMP-3 y la MMP-7 pueden activar a la MMP-1 (19). En este mismo sentido, el caso mejor documentado es el de la MMP-2, cuya activación se lleva a cabo en la superficie celular y depende de la formación de un complejo que involucra a la MT1-MMP y al TIMP-2, aunque recientemente se ha demostrado que la MT2-MMP también puede activar a MMP-2 aún en ausencia de TIMP-2 (20).

Adicionalmente, la función de las MMP depende de la interacción con sus inhibidores endógenos. Los TIMP son los principales inhibidores que regulan la actividad de las MMP en el microambiente tisular y hasta la fecha se han caracterizado 4 miembros (TIMP-1, 2, 3 y 4) (21). Estas proteínas tienen características similares en su estructura pero cada uno muestra

rasgos distintivos en sus propiedades bioquímicas y patrones de expresión. Son moléculas de entre 21-29 kDa y su similitud estructural oscila entre el 37% y 51%. Una característica importante en los TIMP es la presencia de 12 residuos de Cys altamente conservados que se unen y forman 6 puentes disulfuro intracadena que determinan una estructura con 2 dominios: el dominio amino-terminal y el dominio carboxilo-terminal, cada uno de ellos con 3 loops (22). Los TIMP son secretados por una gran variedad de células, incluyendo fibroblastos, macrófagos y células epiteliales y con excepción del TIMP-3 que se une a la MEC a través de proteoglicanos, el resto son formas solubles, aunque TIMP-2 y TIMP-4 se pueden encontrar asociados a proteínas unidas a membrana, como a la MT1-MMP (21).

Los TIMP ejercen su actividad inhibitoria uniéndose a través su dominio amino-terminal con el sitio catalítico de las MMP y cada uno de los TIMP presenta un patrón específico de afinidad por diferentes MMP. Adicionalmente, los TIMP también desencadenan procesos biológicos independientes de su actividad inhibitoria, incluyendo la estimulación de proliferación celular, la inducción o inhibición de apoptosis y participan en la activación de las gelatinasas (23, 24).

Las MMP y los TIMP participan activamente en la remodelación de MEC y en fenómenos biológicos como la proliferación, la migración y la apoptosis, de tal modo que estas proteínas pueden modular procesos fisiológicos, incluyendo diversos aspectos del desarrollo embrionario y la morfogénesis tisular (13). Sin embargo, también se sabe que el incremento en la actividad de las MMP y el deterioro de la función inhibitoria de los TIMP son procesos claves en la patogénesis de enfermedades como la artritis reumatoide (15), el cáncer (25), el enfisema pulmonar(26) y la fibrosis pulmonar (27).

Fibrosis pulmonar.

La fibrosis es una condición patológica que se caracteriza por un acumulo excesivo de moléculas de MEC, principalmente de colágenas. En el pulmón, la fibrosis es el resultado final común de un grupo heterogéneo de padecimientos que afectan el parénquima pulmonar y que en conjunto se agrupan como enfermedades intersticiales pulmonares. De estos padecimientos, la fibrosis pulmonar idiopática o neumonía intersticial usual, es la más común y agresiva. La proliferación excesiva de fibroblastos y el depósito exagerado de colágenas tipos I y III son dos características fundamentales que describen a la fibrosis pulmonar (28, 29).

Se conocen diferentes agentes físicos, químicos y biológicos que pueden desencadenar una respuesta fibrótica en el pulmón, pero a pesar de numerosos estudios en modelos animales y en muestras de pacientes, los mecanismos celulares y moleculares que determinan que una agresión pulmonar sea conducida hacia la fibrosis aún no se conocen con precisión.

La hipótesis clásica que describe la patogénesis de la fibrosis pulmonar sugiere que este padecimiento inicia con una agresión que provoca daño en el epitelio alveolar y el endotelio vascular, lo cual desencadena una respuesta inflamatoria que afecta el intersticio y los espacios alveolares. Esta respuesta se perpetua hasta dar lugar a una fase caracterizada por la proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y el depósito de MEC en el intersticio pulmonar (30, 31). En el marco conceptual de esta propuesta, el daño a los epitelios provoca la liberación de moléculas quimioatrayentes y moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de células inflamatorias, incluyendo macrófagos, neutrófilos, linfocitos y eosinófilos. Moléculas como MCP-1, IL-8 y selectinas están implicadas en este proceso(32). Así mismo, las células inflamatorias liberan diversas citocinas y factores de crecimiento que actúan sobre células residentes del pulmón y favorecen una respuesta inflamatoria prolongada que desencadena el proceso fibrótico (31, 33).

De los mediadores inflamatorios y fibróticos, TGF- β es probablemente el más importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar ya que por si solo es capaz de incrementar la síntesis de colágena en fibroblastos y disminuye la degradación de esta proteína, inhibiendo la expresión de colagenasa intersticial e incrementando la expresión de su inhibidor endógeno TIMP-1 (34). Adicionalmente, TGF- β participa en la transformación de fibroblastos a miofibroblastos, un fenotipo que expresa alfa-actina de músculo liso (α -AML) y se ha sugerido que estos últimos son responsables directos del depósito exagerado de colágena durante la fibrosis (35).

A diferencia de la propuesta tradicional en donde la fibrosis es precedida por la inflamación, recientemente se ha sugerido que la fibrosis pulmonar idiopática, el prototipo de las enfermedades intersticiales, es una patología no inflamatoria que resulta de un proceso que involucra daño en los epitelios alveolares y la remodelación anormal del tejido alrededor de los sitios de lesión, en donde se forman focos de fibroblastos (36).

Estudios muy recientes apoyan la idea de que el epitelio pulmonar desempeña un papel clave en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática y de hecho se ha postulado que esta patología resulta como consecuencia de una alteración en las interacciones celulares entre las células del epitelio alveolar y fibroblastos (37). En este sentido, existen evidencias experimentales de que la sobreexpresión de TGF- β en células del epitelio alveolar induce el desarrollo de lesiones fibrosantes en explantes de pulmón que carecen de células inflamatorias (38). Adicionalmente, se ha sugerido que los focos de fibroblastos representan zonas microscópicas de daño pulmonar agudo y que en estos focos, generalmente localizados alrededor de epitelios dañados, los fibroblastos pueden proliferar, migrar y sintetizar colágenas (36, 39). Cabe destacar que los miofibroblastos son el principal componente de los focos de

fibroblastos (36) y se ha observado que en cultivos de fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática los miofibroblastos se encuentran aumentados (27).

La remodelación anormal del tejido alrededor de los focos de fibroblastos es producto de un desequilibrio en el metabolismo de los componentes que forman parte de la MEC del pulmón y en este contexto, la alteración de la homeostasis de la colágena juega un papel fundamental. Estudios experimentales han demostrado que en la fibrosis pulmonar la síntesis de colágenas intersticiales excede a su degradación y que esto es debido en gran parte a una disminución progresiva de la actividad colagenolítica, lo cual apoya el concepto de que la actividad de la colagenasa intersticial esta involucrada. Interesantemente, durante las fases iniciales de la fibrosis existe un aumento transitorio en la síntesis de colágena tipo I y la actividad colagenolítica se encuentra aumentada, lo cual sugiere una activa remodelación de la MEC (40-42).

Se han establecido diversos modelos animales para el estudio de la fibrosis pulmonar y de estos, el modelo de fibrosis inducido por bleomicina ha sido uno de los más utilizados (32). La bleomicina es un antibiótico con propiedades antitumorales y la instilación intratraqueal de este fármaco desencadena una respuesta inflamatoria en el intersticio que progresa a una fase fibroproliferativa y culmina con el depósito de colágena causando una fibrosis difusa en el parénquima pulmonar (43) y a pesar de que no es una replica exacta de la enfermedad en humanos, las lesiones fibróticas y los mecanismos implicados en su desarrollo muestran similitudes importantes. Por ejemplo, en este modelo se ha observado un incremento de TGF- β 1 acompañado por la presencia de un mayor número de miofibroblastos (44).

Diversas moléculas y distintos tipos celulares han sido implicados en el desarrollo de la fibrosis inducida por bleomicina. En este contexto, existen evidencias que sugieren que los

eosinófilos son células claves para el desarrollo de la fibrosis ya que estas células producen grandes cantidades de TGF- β 1 en los sitios fibróticos (44) y se ha demostrado que el reclutamiento y la activación de estas células mediados por IL-5 son eventos claves en este proceso y de hecho, se ha observado que el uso de un anticuerpo anti-IL-5 reduce significativamente el influjo de eosinófilos, lo cual se acompaña por una reducción en la expresión de TGF- β 1 y MCP-1 con la subsecuente reducción en la fibrosis (45).

Por otra parte, existen evidencias que sugieren que las MMP desempeñan un papel clave en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Diferentes trabajos experimentales han mostrado que el desarrollo de una respuesta fibrosante se asocia con una elevada actividad de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9. Estas dos enzimas pueden degradar componentes de las membranas basales y favorecer el remodelamiento anormal que ocurre en patogénesis de la fibrosis (46-47). Asimismo, la matrilisina (MMP-7) es una enzima que se encuentra aumentada en pulmones de pacientes con fibrosis y los ratones que carecen del gen de esta enzima desarrollan considerablemente menos lesiones fibróticas que los ratones que si tienen el gen cuando son agredidos con bleomicina (48). Adicionalmente, el uso de batimastat, un inhibidor sintético de MMP, reduce la fibrosis y la actividad de MMP-2 y MMP-9 en ratones instilados con bleomicina (49).

Humo de cigarro y fibrosis pulmonar.

Fumar es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas como el enfisema, una enfermedad que se caracteriza por la ruptura de paredes alveolares y el agrandamiento anormal y permanente de los espacios aéreos (50). El daño pulmonar provocado por el humo de cigarrillo es producto de la compleja mezcla de compuestos que se liberan durante su combustión, incluyendo moléculas altamente reactivas al

oxígeno. Estas moléculas generan un ambiente de estrés oxidativo que afecta el intersticio pulmonar lo cual desencadena una respuesta caracterizada por un incremento de células inflamatorias, particularmente de neutrófilos y macrófagos. La activación de estas células conduce a un desequilibrio entre enzimas y sus inhibidores que resulta en la proteólisis de la MEC y la subsecuente ruptura de las paredes alveolares. En este proceso participan diferentes enzimas, incluyendo la elastasa de neutrófilos además de varias MMP (51, 52). En este contexto, se ha demostrado que el enfisema experimental inducido por la exposición a humo de cigarrillo se acompaña de un aumento en la expresión, producción y actividad de la colagenasa intersticial (MMP-1) (26). Adicionalmente, se ha observado un marcado incremento en la producción y actividad de la MMP-9 en cobayos expuestos a humo de cigarrillo y de hecho la actividad de la MMP-9 y de la MMP-1 se ve disminuida con el uso de un inhibidor de amplio espectro de MMP, lo cual se acompaña de una disminución en el daño enfisematoso provocado por el humo de cigarrillo (53).

El humo de cigarrillo también ejerce sus efectos en procesos pulmonares inflamatorios y fibróticos (54). Sin embargo, la relación entre el hábito de fumar y la fibrosis pulmonar no se ha estudiado con profundidad. A pesar de que la mayoría de los efectos del humo de cigarro son adversos, existen reportes que sugieren que fumar puede proteger de ciertos padecimientos fibrosantes pulmonares como la sarcoidosis, la neumonitis por hipersensibilidad y la neumonitis inducida por radiaciones (54, 55). Interesantemente, diversas evidencias clínicas y epidemiológicas sugieren que fumar puede influenciar la severidad y el desarrollo de enfermedades intersticiales (56). Por ejemplo, fumar está fuertemente relacionado con la bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedades intersticiales pulmonares, un padecimiento inflamatorio frecuente en la mayoría de los fumadores crónicos; la neumonía intersticial descamativa, una afección acompañada de inflamación, fibrosis difusa y cambios

enfisematosos. Así mismo, el granuloma eosinofílico, una patología de causa desconocida caracterizada por la acumulación de células de Langerhans, también se asocia fuertemente con el hábito de fumar (56, 57). Adicionalmente, se ha establecido que fumar es un factor de riesgo importante para la fibrosis pulmonar idiopática y en la mayoría de los casos se ha asociado con un peor pronóstico (58, 59).

Los mecanismos celulares y moleculares por los cuales fumar puede influenciar en una u otra vía las respuestas inflamatorias y fibróticas del pulmón aún no se han dilucidado. Por un lado, existen reportes de que el humo de cigarro tiene la capacidad de disminuir algunas actividades de los macrófagos (60), pero por el otro lado, se ha visto que promueve la activación sistémica de (61) y se ha sugerido que la infiltración de en respuesta al humo de cigarro está mediada por un mecanismo oxidativo que activa a NF- κ B, incrementando los niveles de IL-8 en macrófagos alveolares (62). Además, el humo de cigarro participa en la remodelación del intersticio pulmonar incrementando la expresión y liberación de citocinas e induciendo la liberación de factores pro-fibrosantes unidos a la MEC a través del incremento en la actividad de MMP (10). En este sentido, un estudio reciente mostró que las células epiteliales de las vías aéreas menores de pacientes fumadores expresan grandes cantidades de TGF- β (63) lo cual podría contribuir a incrementar la respuesta fibrótica en áreas específicas del pulmón. Por otro parte, se ha observado la presencia de inflamación y fibrosis bronquial en sujetos fumadores y ambas lesiones ocurren independientemente del enfisema pulmonar (64).

Diversas moléculas reactivas del oxígeno que se generan al fumar cigarrillos, como el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$) pueden provocar alteraciones estructurales y funcionales de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (65). El daño oxidativo provocado por el humo de cigarro se ve reflejado directamente en la integridad del

epitelio alveolar. Estudios *in vitro* han demostrado que el humo de cigarro incrementa la permeabilidad de neumocitos tipo II a expensas de una disminución en la producción de glutatión, un tripéptido que actúa como antioxidante intracelular y extracelular. Adicionalmente el humo de cigarro también puede inhibir la proliferación y la unión de neumocitos tipo II lo que reduce la posibilidad de que el epitelio alveolar pueda ser expeditamente reparado ante la agresión por el daño oxidante (66, 67).

Una consideración que es importante considerar entre la probable interacción del hábito de fumar y la progresión de una enfermedad intersticial está relacionada con el tiempo entre la exposición al humo de cigarro y el daño fibrótico. En este sentido, este trabajo fue diseñado para evaluar experimentalmente los efectos del humo de cigarro en la respuesta fibrosante pulmonar.

OBJETIVO

- Investigar los efectos de la exposición previa y simultánea a humo de tabaco sobre la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en cobayos. Analizar algunos de los mecanismos involucrados.

HIPÓTESIS.

- La exposición a humo de tabaco incrementa la respuesta pulmonar fibrosante inducida por bleomicina.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales.

Se utilizaron cobayos (Hartley; Harlam Sprague Dawley; Madison, WI) hembras con pesos aproximados de 380-420 g. Durante el desarrollo de este trabajo los animales se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos y alimentados *ad libitum* con una dieta basada en croquetas y agua esterilizada dentro del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Exposición a humo de tabaco.

Los cobayos fueron expuestos al humo producido por la combustión de 20 cigarros comerciales sin filtro por día, 5 días a la semana y durante 6 semanas de acuerdo a un modelo previamente descrito (26). Brevemente, los animales se colocaron dentro de una cámara de acrílico y fueron expuestos al humo de tabaco por periodos de 30 minutos, 4 veces al día, con intervalos de 30 minutos de exposición a aire corriente entre cada una de ellas. Como controles se utilizaron animales expuestos únicamente a aire corriente.

Tratamiento con bleomicina.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (25 mg/Kg i.p) e instilados por vía intratraqueal con una sola dosis de 3U de sulfato de bleomicina (Blanoxan, Bristol-Myers, Syracuse, NY) en 0.5 mL de solución salina al 0.9% estéril. Los animales del grupo control fueron instilados únicamente con solución salina estéril.

Modelo experimental.

Para este estudio los cobayos se dividieron en 5 grupos de 8 animales que fueron tratados como se explica a continuación:

- 1) Animales expuestos a humo de tabaco y sacrificados después de 6 semanas de exposición (**HT**)
- 2) Animales tratados con bleomicina y sacrificados 6 semanas después de haber sido instilados (**B**)
- 3) Animales tratados con bleomicina y expuestos a humo de tabaco simultáneamente durante 6 semanas (**B+HT**)
- 4) Animales que primero fueron expuestos a humo de tabaco durante 6 semanas y posteriormente instilados con bleomicina y sacrificados 6 semanas después (**HT/B**)
- 5) Animales controles expuestos a aire corriente e instilados con solución salina (**C**)

Análisis morfológico.

Cada uno de los cobayos se anestesió y enseguida se procedió a abrir el tórax para dejar los pulmones al descubierto. La sangre circulante en los pulmones se eliminó introduciendo 30 mL de PBS (buffer de fosfatos 0.015 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4) a través de la arteria pulmonar y el pulmón derecho fue removido y fijado con paraformaldehído al 4% e instilado a una presión constante de 25 cm H₂O. El pulmón insuflado se mantuvo durante 3 horas a 4 °C en la solución fijadora y después se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno con PBS en frío.

Se hicieron cortes transversales y longitudinales del pulmón y bloques de 2-3 mm de grosor fueron incluidos en parafina y procesados con técnicas histológicas convencionales para obtener laminillas con cortes de tejidos de 4-5 µm de espesor. Para su uso en inmunohistoquímica, los cortes de tejidos fueron depositados en laminillas siliconizadas

(Sigma). Las alteraciones patológicas se determinaron a través de un análisis con microscopia de luz en tejidos teñidos con Hematoxilina-Eosina y con la técnica tricrómica de Masson.

Medición de hidroxiprolina.

Se determinó el contenido de hidroxiprolina como un indicativo del contenido de colágena en el pulmón izquierdo de 8 animales en cada grupo. Los pulmones se homogenizaron en 10 mL de PBS y alícuotas de 1 mL del homogenado fueron hidrolizadas en 1 ml de HCl 12 N durante 24 horas a 110 °C. Se realizó una determinación colorimétrica del contenido de hidroxiprolina de acuerdo a la técnica descrita por Woessner (68), la cual se basa en la oxidación de la muestra con cloramina-T, la separación del inminoácido oxidado con tolueno y su reacción con p-dimetil-amino-benzaldehído, determinando la absorbancia de las muestras a 560 nm. Para cada animal los ensayos se hicieron por triplicado y los valores fueron expresados como μg de hidroxiprolina/pulmón.

Lavados broncoalveolares (LBA).

En un experimento paralelo, 6 animales de cada grupo fueron sacrificados como se describió anteriormente. El pulmón derecho de cada animal fue separado e inmediatamente congelado a -80 °C hasta su uso para zimografía. En el pulmón izquierdo se hicieron 3 lavados de 5 mL con solución salina estéril a 37 °C. La solución se instiló por la traquea con ayuda de una cánula y una jeringa y el fluido del LBA se recuperó mediante aspiración suave. El fluido recuperado fue centrifugado a 400 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue alícuotado y congelado a -80 °C hasta su uso y las células fueron resuspendidas en 1 mL de PBS.

Una alícuota de 100 μl fue separada y usada para realizar un conteo total de las células recuperadas con ayuda de un hemocitómetro. Las células restantes se fijaron con una mezcla

de alcohol etílico al 50% y carbowax al 2% (polietilen-glicol 50%) y se utilizaron para realizar un conteo diferencial de células sobre laminillas que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. La cuenta diferencial se llevó a cabo con un microscopio de luz con un objetivo de 40X, seleccionando 300-500 células en 10 campos diferentes y en cada caso las mediciones fueron hechas por duplicado.

Análisis de proliferación de fibroblastos de pulmón.

Se establecieron cultivos de fibroblastos de pulmón de cobayo de la línea celular JH-4 (pasajes 5-8) (ATCC, Rockville, MD) cultivados en frascos T-25 cm² (Costar, Corning Inc. NY) con medio nutriente de Ham F-12 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, de Fetal Bovine Serum), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina y 2.5 µg/mL de anfoterisina a 37 °C y mantenidos en un incubador con una mezcla de 95% aire y 5% CO₂. Los fibroblastos se crecieron a confluencia y se cosecharon con Tripsina-EDTA. Después de eliminar la tripsina, las células se resuspendieron en medio F-12 con FBS al 10% y se contaron con un hemocitómetro.

Las células se sembraron en cajas de 96 pozos a una densidad celular de 7×10^3 células/pozo y después de 12 horas el medio fue remplazado con medio F-12 con FBS al 1% o con el mismo medio más 20% del fluido de los LBA de animales controles y experimentales que previamente fueron concentrados 4X y esterilizados utilizando una unidad de filtración con membrana PVDF con poro de 0.22 µm (Millex-GV, Millipore, France).

Después de 96 horas de estímulo, el número de células en cada uno de los pozos se determinó con el reactivo de proliferación celular WST-1 (Boehringer Mannheim), una sal de tetrazolium que se oxida en la cadena respiratoria de células viables y forma un cromóforo soluble llamado formazán. Brevemente, el medio de las células se remplazó con 100 µL de medio F-

12 sin suero y se adicionaron 10 μ L del reactivo WST-1. Después de incubar 3 horas a 37 °C, el medio se colectó y se determinó la absorbancia de las muestras en un lector de ELISA a 450 nm, utilizando un filtro de referencia a 620 nm ($Abs_{450nm}-Abs_{620nm}$). El porcentaje de crecimiento celular se determinó como la diferencia del incremento en los valores de absorbancia a las 96 horas respecto a los valores basales (Día 0). Estos ensayos fueron hechos por cuadruplicado.

Cuantificación de IL-4 y TIMP-2 en el fluido de LBA.

Para determinar la concentración de IL-4 y TIMP-2 en el fluido de los LBA, muestras de 6 animales de cada grupo fueron dializadas y concentradas 4X para su uso en inmunoensayos unidos a enzima (ELISA, de Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

La concentración de IL-4 se determinó usando un kit comercial de ELISA (Quantikine HS, R&D, Minneapolis, MN) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los niveles de TIMP-2 fueron determinados en las mismas muestras usando un sistema comercial de ELISA para humano que puede detectar la molécula de TIMP-2 libre en cobayos (Amersham Pharmacia Biotech Inc. NJ). Los valores de IL-4 y TIMP-2 en cada una de las muestras fueron calculados interpolando los valores bajo su respectiva curva estándar. Las concentraciones se muestran como pg/mg proteína. Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado.

Inmunohistoquímica.

Se exploró la presencia de IL-4, TIMP-2 y α -actina de músculo liso (α -AML) en muestras de tejidos por inmunohistoquímica como se describe a continuación.

Los tejidos fueron desparafinados con xilol durante 20 min y rehidratados. Después de bloquear la actividad de peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3%, las muestras se incubaron en

buffer de citratos 10 mM pH 6.0, calentado en un horno de microondas por 5 min. Para reducir el background, los tejidos se trataron con una solución bloqueadora (BioGenex, San Ramon CA) y se incubaron 18 horas a 4 °C con los siguientes anticuerpos: monoclonal anti- α -AML humano [5 μ g/mL] (Dako, Corp., Carpinteria, CA), monoclonal anti-TIMP-2 humano [7.5 μ g/mL] (Fuji Chemical Industries, JP) y anti-IL-4 humano [2 μ g/mL] (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA). Como controles negativos se utilizaron muestras en donde el anticuerpo primario fue remplazado con suero no inmune.

Se utilizó un anticuerpo secundario marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa (BioGenex) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para revelar, las muestras se incubaron con 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, BioGenex) en buffer de acetatos con 0.05% de H₂O₂ y las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina.

Evaluación de α -Actina de Músculo Liso.

Se determinó el porcentaje de células positivas a α -actina de músculo liso en 20 campos de secciones con alteraciones fibróticas e inflamatorias en tejidos de animales de los grupos B, B+HT y HT/B. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio Nikon Eclipse E600 conectado a una cámara Sony SSC-DC54A utilizando un objetivo de 40X. Cada una de las imágenes fue adquirida y procesada con ayuda del software de análisis de imágenes MetaMorph 4.5 (Universal Imagin Corp. USA). El número total de células se determinó ajustando un valor automático para el umbral de los núcleos teñidos con hematoxilina en cada campo y entonces, un nuevo valor de umbral fue ajustado para registrar las células con marca positiva. Para el análisis, se contó aproximadamente el mismo número de células (de 3304 a 4074). Las células positivas del músculo liso de los bronquiólos, los vasos sanguíneos y

aquellas que se localizan en la periferia de los sacos alveolares fueron eliminadas manualmente del conteo.

Zimogramas de tejidos.

Se evaluó la presencia de MMP con actividad gelatinolítica en el extracto de pulmones congelados mediante zimografía (47). El tejido pulmonar (25 mg/mL) fue homogenizado en buffer CHAPS 10 mM-HEPES 20mM (pH 7.5)-NaCl 150 mM y centrifugado a 9500 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue inmediatamente separado y posteriormente se determinó la concentración total de proteínas utilizando el ensayo para proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Lab. Inc., CA).

Muestras que contenían 15 µg de proteína total se mezclaron (V/V) con buffer Laemmli (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8-SDS 3%-glicerol-azul de bromofenol 0.05%). Las muestras se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE al 8.5% conteniendo gelatina (1 mg/mL), utilizando un voltaje constante de 150 V y manteniendo la temperatura del buffer de corrida a 12 °C. Después de la electroforesis, los geles se lavaron 2 veces con Triton X-100 al 2.5% durante 20 min y se incubaron 18 horas a 37 °C con un buffer de glicina 100 mM-CaCl₂ 5 mM-ZnCl₂ 0.25 mM.

Los geles se tiñeron durante 1 hora con azul Coomassie al 0.1% (Brillant Blue R-250, Sigma) y entonces se destiñeron 30 min con una solución de metanol-ácido acético (40%-5%). Como muestra control para la MMP-2 y la MMP-1, se utilizó medio condicionado libre de suero de fibroblastos de pulmón humano estimulados con FGF-1 más heparina. Como control positivo para la MMP-9, se uso medio condicionado libre de suero de células de osteosarcoma humano U2-OS (ATCC HTB 96) estimuladas con PMA.

Todos los geles se digitalizaron con una cámara Kodak DC-120 (Eastman Kodak, Rochester, NY) utilizando los mismos valores de exposición y saturación de luz. Se realizó un análisis densitométrico con el software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science) determinando la intensidad de las bandas con actividad gelatinolítica correspondientes a la MMP-2 y MMP-9.

Análisis estadístico.

En este trabajo, todos los valores están expresados como el promedio \pm desviación estándar. Para evaluar si existen o no diferencias significativas se aplicó un análisis de varianza de una vía, utilizando el método de Tukey.

RESULTADOS.

Morfología.

Los cambios morfológicos en los animales expuestos a las diferentes condiciones experimentales se ejemplifican en la Figura 1. En el caso de los cobayos expuestos a humo de tabaco (HT) se observaron zonas de inflamación intersticial y peribronquiolar, además de cambios de tipo enfisematosos (Figura 1B). En relación a los cobayos tratados con bleomicina (B), estos desarrollaron áreas focales de inflamación y fibrosis intersticial como se observa en la Figura 1C. En el caso de los animales agredidos con humo de tabaco y bleomicina las lesiones fibróticas que se observaron fueron mas severas (Figura 1D-F), sin embargo, la respuesta fibrótica fue aún mucho mayor en aquellos animales que primero fueron expuestos a humo de tabaco y después tratados con bleomicina (HT/B) (Figura 1E y F). No se observaron cambios morfológicos en los pulmones de los cobayos del grupo control (Figura 1A).

Inmunolocalización de células positivas a α -AML.

En la Figura 2 se muestra la inmunolocalización de α -actina de músculo liso en pulmones de cobayos representativos de los diferentes grupos experimentales. Con este anticuerpo, además de células de músculo liso presentes en la pared de los conductos alveolares, también se tiñen miofibroblastos. El análisis semicuantitativo del porcentaje de células positivas a α -actina de músculo liso en secciones con cambios inflamatorios y fibróticos mostró que los grupos que recibieron bleomicina y fueron expuestos a humo de tabaco HT/B y B+HT presentan un

incremento en el número de células positivas a α -actina comparados con los grupos HT y B (3.73 ± 1.52 y 3.35 ± 1.23 % versus 1.89 ± 1.31 y 2.28 ± 1.49 % respectivamente; $p < 0.05$).

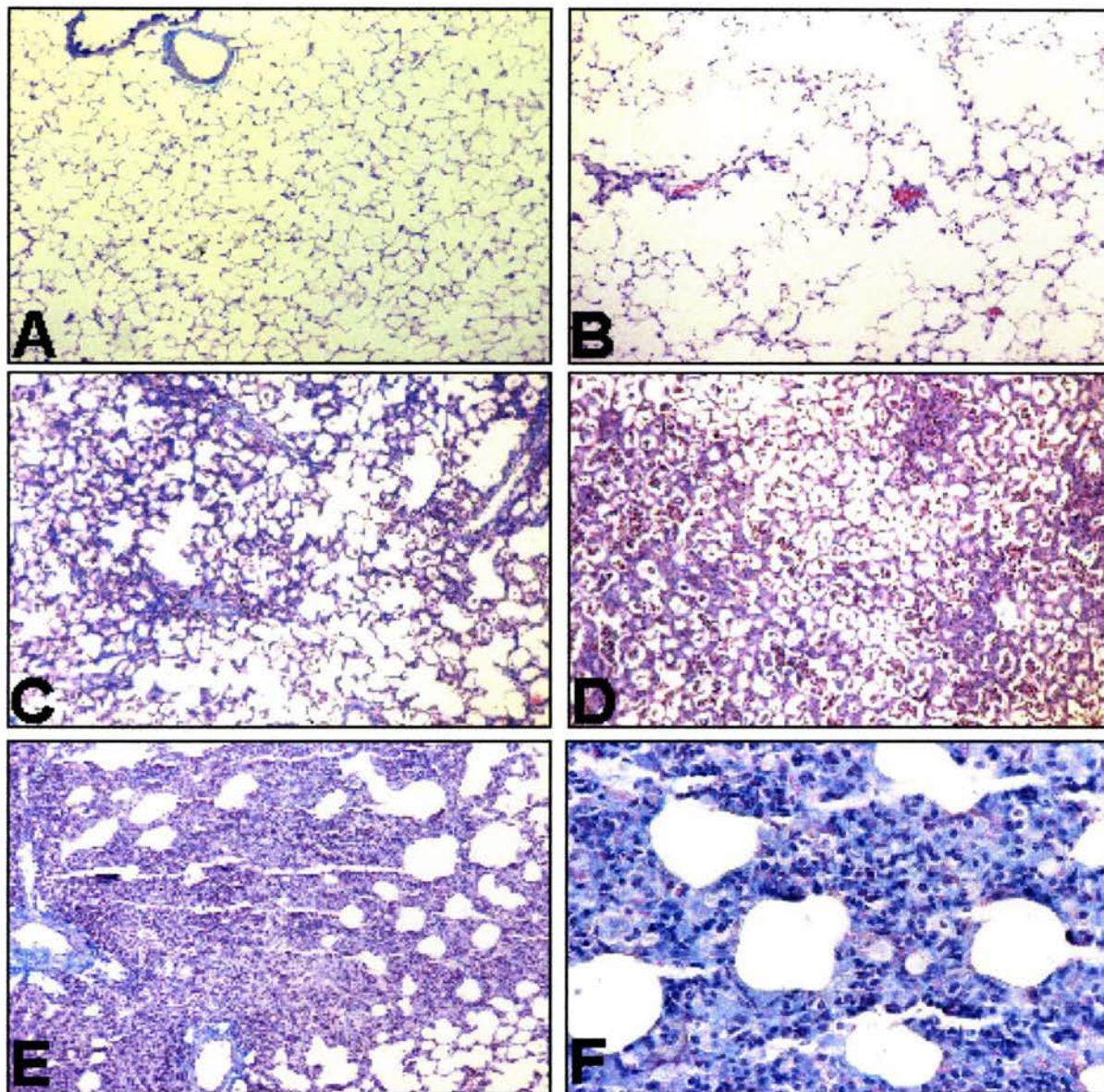


Figura 1. Fotomicrografías de pulmón de cobayos teñidas con tricrómica de Masson. Panel **A**: control; panel **B**: tratados con humo de tabaco; panel **C**: instilados con bleomicina; panel **D**: tratados con bleomicina y humo de tabaco simultáneamente; paneles **E** y **F**: expuestos primero a humo de tabaco y después tratados con bleomicina. Paneles **A-E**: aumento original 10X; **F**: aumento original 40X.

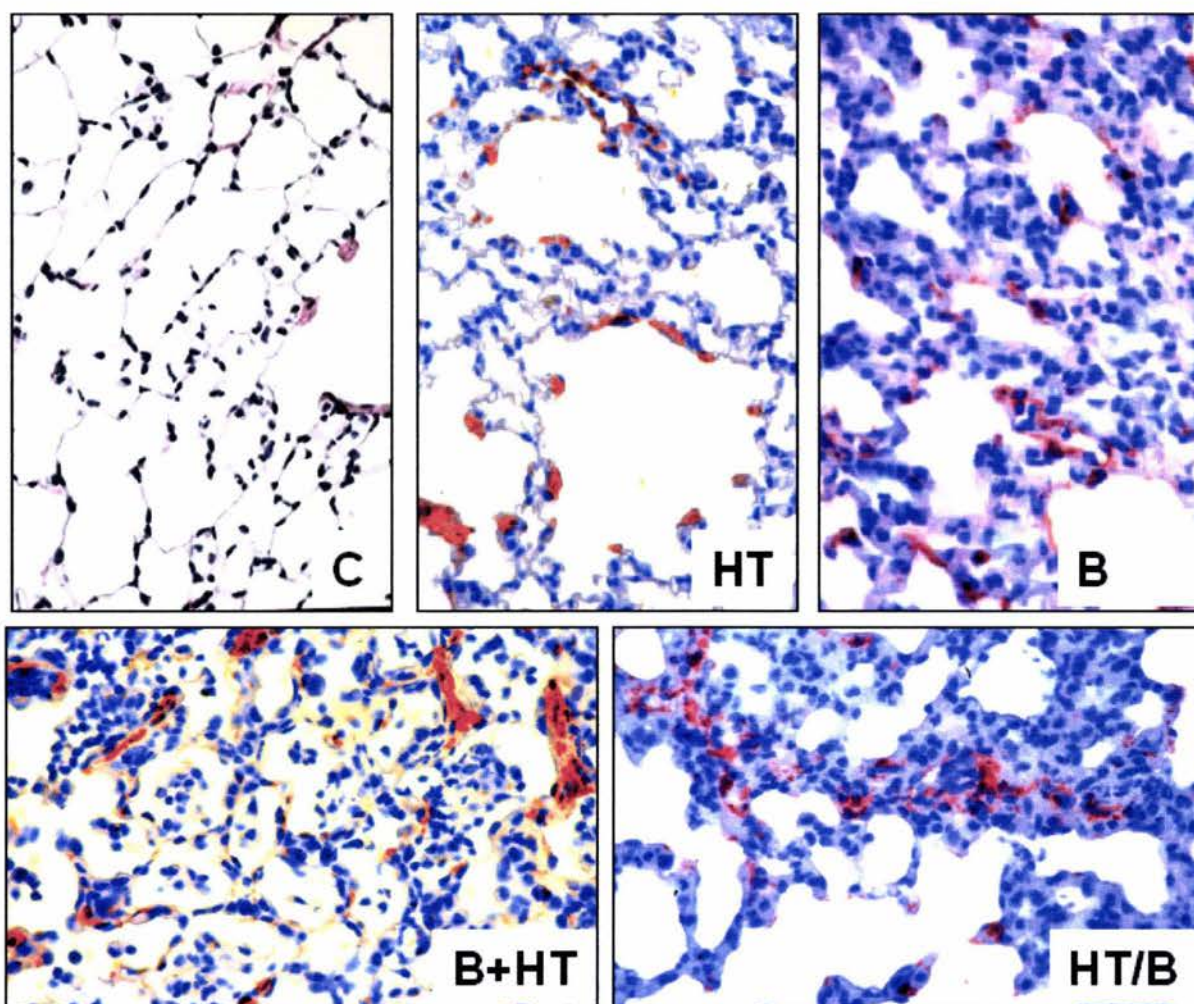


Figura 2. Fotomicrografías de pulmón de cobayos en los cuales se detecto la presencia de α -actina de músculo liso por inmunohistoquímica. **C:** cobayo control. **HT:** expuesto a humo de cigarro. **B:** tratado con bleomicina. **B+HT:** instilado con bleomicina y expuesto a humo de tabaco simultáneamente. **HT/B:** expuestos primero a humo de tabaco y después tratados con bleomicina. Aumento original 40X.

Cuantificación de hidroxiprolina.

La acumulación de colágena pulmonar se cuantificó midiendo el contenido total de hidroxiprolina (figura 3). Los tres grupos de animales que recibieron bleomicina, ya sea sola o con la exposición simultánea o posterior a humo de tabaco mostraron un incremento significativo en el contenido de hidroxiprolina comparados contra los controles (2.4 ± 0.2 en

B, 2.9 ± 0.4 en **B+HT** y 3.5 ± 0.7 en **HT/B** vs 1.2 ± 0.22 mg/pulmón **C**; $p < 0.01$). Cuando los 3 grupos tratados con bleomicina se compararon, se encontró un incremento significativo en el contenido de hidroxiprolina en el grupo que fue expuesto primero a humo de tabaco y después instilado con bleomicina (**HT/B**) en relación con el grupo que solo recibió bleomicina (3.5 ± 0.7 mg/pulmón en **HT/B** vs 2.4 ± 0.2 mg/pulmón en **B**; $p < 0.01$). El contenido de hidroxiprolina pulmonar en los cobayos expuestos a humo de tabaco (**HT**) no mostró diferencias significativas al ser comparado con el grupo control (1.2 ± 0.22 mg/pulmón vs 1.4 ± 0.18).

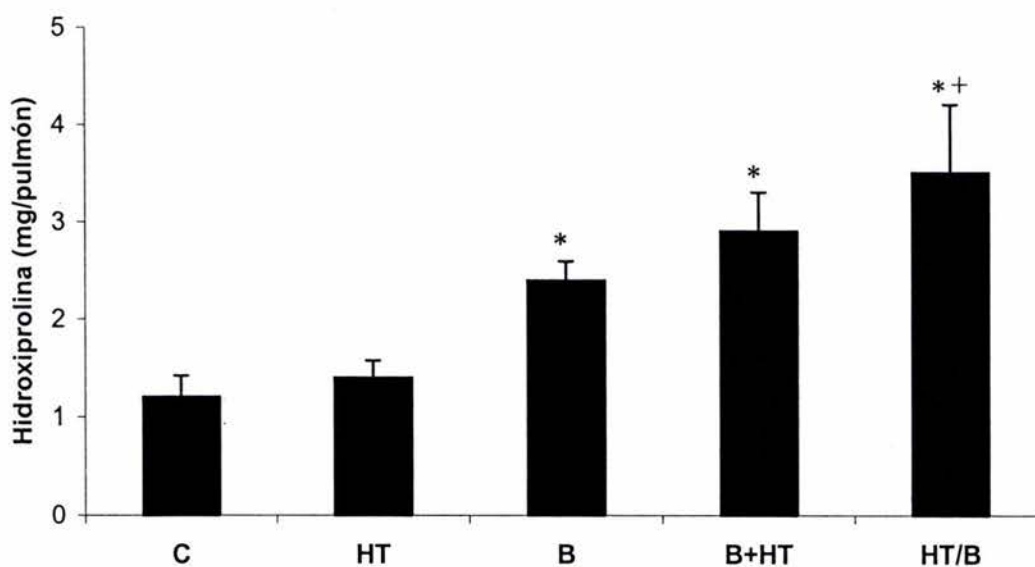


Figura 3. Efecto del humo de tabaco y/o la instilación de bleomicina en el contenido de hidroxiprolina en pulmón de cobayos. * $p < 0.01$ comparado con el control; + $p < 0.01$ comparado contra los otros dos grupos que fueron tratados con bleomicina ($n=8$).

Lavados broncoalveolares.

El volumen de fluido recuperado en los animales controles y experimentales fue del 82 al 85 % del volumen original instilado sin diferencias significativas en los diferentes grupos experimentales.

En todos los grupos experimentales aumentó el número total de células recuperadas en comparación con el control (1.35 ± 0.39 en **HT**; 1.5 ± 0.22 en **B**; 1.43 ± 0.53 en **B+HT**; 1.07 ± 0.04 en **HT/B**; 0.7 ± 0.1 células $\times 10^6/\text{ml}$ en **C**). En la Figura 4 se muestra el resultado del análisis de la cuenta diferencial de células recuperadas en los LBA. Cuando se comparó el porcentaje de las diferentes poblaciones celulares en los LBA de los distintos grupos experimentales afloraron las siguientes observaciones. Por un lado un incremento significativo en el porcentaje de neutrófilos en los animales de los grupos que fueron expuestos a humo de tabaco y aquellos que recibieron bleomicina simultáneamente a la exposición al humo en comparación con el grupo control (**HT**: 9.5 ± 4.9 %; **B+HT**: 8 ± 4.8 %; **C**: 0.83 ± 0.8 %; $p < 0.05$). Por otro lado, también se observó un incremento significativo en el porcentaje de eosinófilos en los animales que primero fueron expuestos a humo de tabaco y después instilados con bleomicina (29.7 ± 10 % en **HT/B** vs 4.8 ± 4.4 % en **C**; $p < 0.05$).

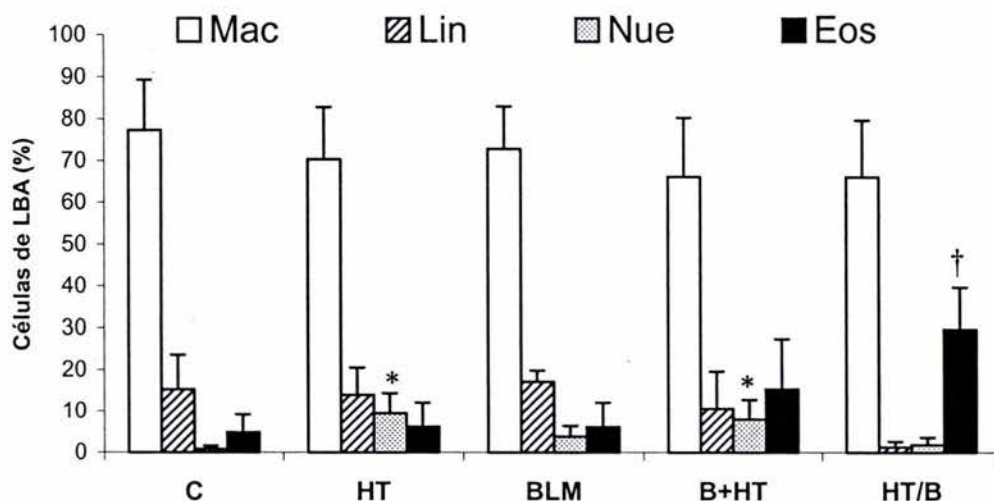


Figura 4. Perfil celular en el LBA de cobayos control (**C**), expuestos a humo de tabaco (**HT**), tratados con bleomicina (**B**), tratados con bleomicina y humo de tabaco simultáneamente (**B+HT**) y expuestos primero a humo de tabaco y después tratados con bleomicina (**HT/B**). **Mac**: macrófagos; **Lin**: linfocitos; **Neu**: neutrófilos y **Eos**: eosinófilos. * $p < 0.05$ para neutrófilos cuando se compara contra todos los grupos; † $p < 0.05$ para eosinófilos comparado contra todos los grupos.

Proliferación de fibroblastos.

Con el fin de analizar si los LBA derivados de los diferentes grupos experimentales tienen algún efecto sobre el crecimiento de fibroblastos de pulmón de cobayos, se determinó el número de células después de 96 horas de estímulo utilizando el reactivo de proliferación celular WST-1 y se calculó el porcentaje de crecimiento celular sobre el valor de los fibroblastos creciendo con medio F12 suplementado con FBS al 1%.

Como se muestra en la Figura 5, la tasa de crecimiento de fibroblastos estimulados con el LBA de animales del grupo control solo se incrementó en un $6.27 \pm 1.2\%$ respecto a los fibroblastos que fueron incubados únicamente en presencia de FBS al 1%.

Los fibroblastos que fueron estimulados con el LBA de los diferentes grupos experimentales (**HT**, **B**, **B+HT** y **HT/B**) mostraron todos un incremento significativo en la tasa de crecimiento comparados contra el grupo control (**HT**: $53.84 \pm 1.8\%$; **B**: $50.64 \pm 4.5\%$; **B+HT**: $66.62 \pm 2.6\%$; **HT/B**: $83.38 \pm 4.6\%$, $p < 0.05$). Interesantemente, el LBA de animales del grupo **HT/B** presentó además un incremento significativo en la proliferación de fibroblastos comparado con los grupos **HT** y **B** ($p < 0.01$).

La adición de un anticuerpo neutralizante contra IL-4 inhibió significativamente la proliferación de fibroblastos estimulados con el LBA de los cobayos del grupo **HT/B** ($62.7 \pm 3.4\%$; $p < 0.01$).

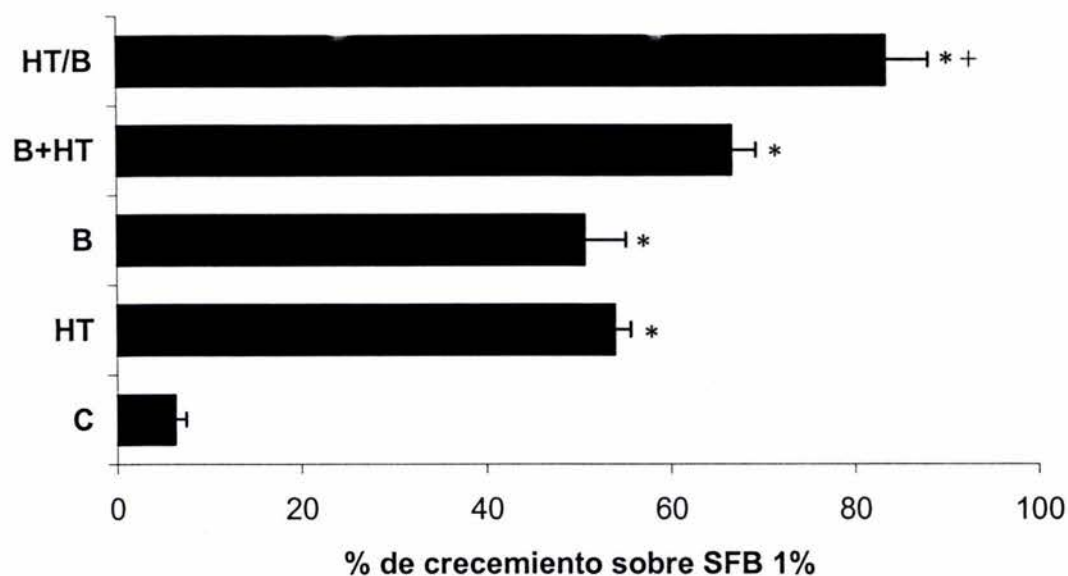


Figura 5. Proliferación de fibroblastos de pulmón de cobayo después de 96 horas de haber sido estimulados con fluido de lavados broncoalveolares de cobayos control (**C**), expuestos a humo de tabaco (**HT**), tratados con bleomicina (**B**), tratados con bleomicina y humo de tabaco simultáneamente (**B+HT**), expuestos primero a humo de tabaco y después tratados con bleomicina (**HT/B**). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar * $p < 0.05$ comparando contra el grupo C; + $p < 0.01$ comparando contra los grupos HT y BLM.

IL-4 y TIMP-2 en LBA.

Con el fin de determinar los niveles de algunas citocinas/quimiocinas que pudieran estar asociadas con la proliferación de fibroblastos, se realizaron ensayos de ELISA en los fluidos de los LBA. De varias moléculas analizadas (IL-13, IL-12, IL-1) sólo IL-4 y TIMP-2 mostraron diferencias importantes en los diferentes grupos experimentales.

En el caso de IL-4, como se observa en la Figura 6A, de nuevo el grupo que primero fue expuesto a humo de tabaco y después tratado con bleomicina mostró un incremento significativo en los niveles de IL-4 comparado con cualquiera de los otros grupos experimentales (18.1 ± 5.5 en **HT/B** vs 12.4 ± 1.9 en **C**; 11.2 ± 2.8 en **HT**; 8.3 ± 2.7 en **B** y 11.3 ± 2.7 pg/mg proteína en **B+HT**; $p < 0.05$).

Por otro lado, cuando se midió por ELISA la presencia de TIMP-2 en el LBA, como se muestra en la Figura 6B los niveles de TIMP-2 muestran un incremento significativo en el grupo **HT/B** con respecto a los otros grupos, en los cuales los niveles de TIMP-2 fueron muy similares (213.8 ± 53.5 en **HT/B** versus 72.3 ± 5.1 en **C**; 68.3 ± 13.4 en **HT**; 80.7 ± 9.2 en **B** y 107.1 ± 14.6 pg/mg proteína en **B+HT**; $p < 0.01$).

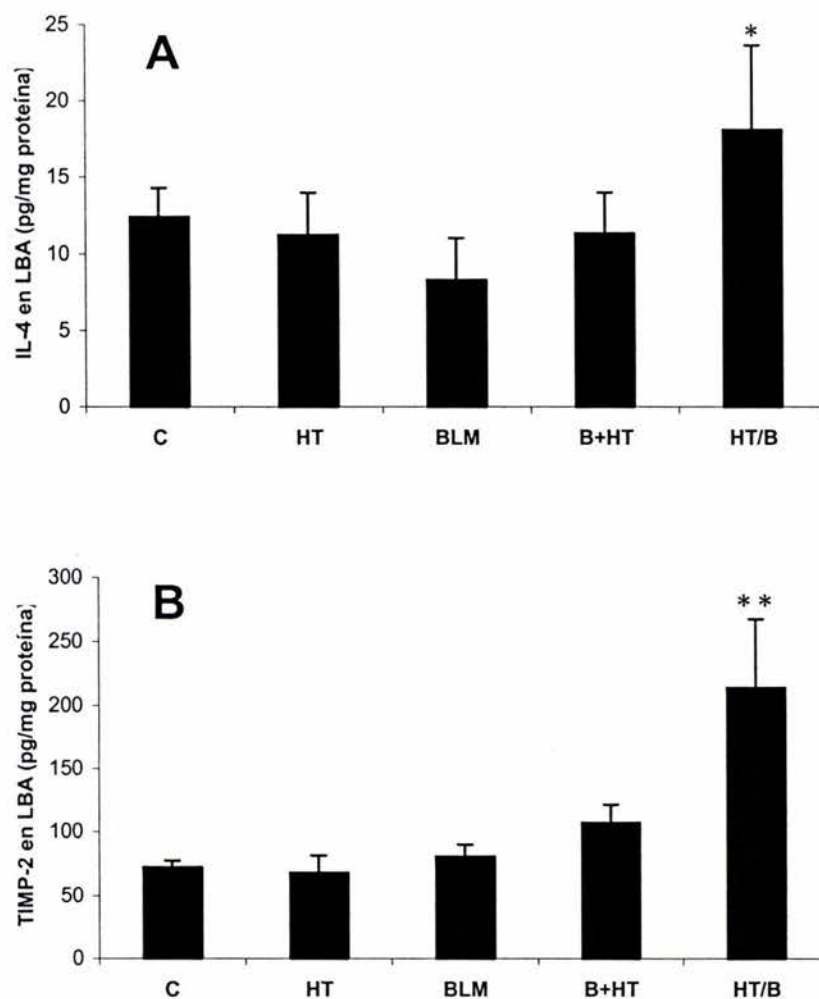


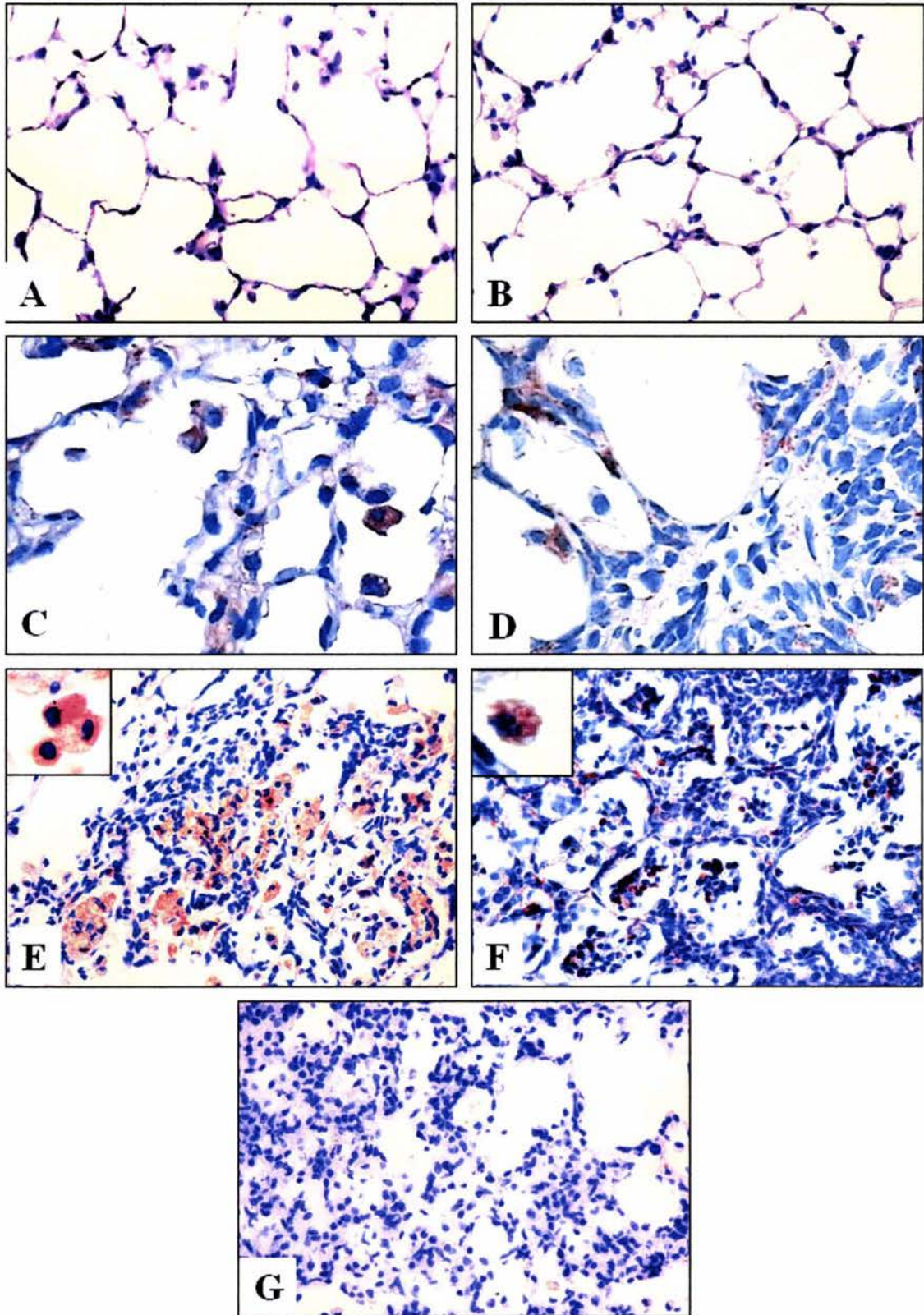
Figura 6. Niveles de IL-4 (A) y TIMP-2 (B) en el fluido del LBA de cobayos control (C), expuestos a humo de tabaco (HT), tratados con bleomicina (B), tratados con bleomicina y humo de tabaco simultáneamente (B+HT) y expuestos primero a humo de tabaco y después tratados con bleomicina (HT/B). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de 6 animales.

Inmunolocalización de IL-4, TIMP-2.

Para determinar la fuente celular de IL-4 y TIMP-2, se evaluó la expresión de estas proteínas en cobayos control, cobayos instilados con bleomicina y cobayos tratados con humo de tabaco y bleomicina. Como se muestra en la Figura 7, ambas proteínas (IL-4 y TIMP-2) fueron expresadas principalmente por macrófagos intersticiales y alveolares en los animales que fueron instilados con bleomicina (Paneles C y D). Este mismo patrón se observó en los pulmones del grupo que primero fue expuesto a humo de tabaco y después tratado con bleomicina (Paneles E y F). Como se muestra en los paneles A y B, IL-4 y TIMP-2 prácticamente no se detectaron en los pulmones de los animales del grupo control. Las muestras incubadas con suero no-inmunorreactivo se muestran en el panel G.

Figura 7. Localización de IL-4 y TIMP-2 en pulmón de cobayos tratados con bleomicina (C y D) y cobayos expuestos primero a humo de tabaco y después agredidos con bleomicina (E y F). Las proteínas inmunoreactivas fueron reveladas con 3-amino-9-etil-carbazol y los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. Panel A: pulmón de un animal control para IL-4. Panel B: pulmón de cobayo control para TIMP-2. Panel C y D: macrófagos marcados para IL-4 y TIMP-2 respectivamente (60X). Panel E muestra varios macrófagos marcados para IL-4 (40X) y el inserto a mayor aumento (100X). Panel F muestra macrófagos alveolares con marca positiva para TIMP-2 (40X) y el inserto a mayor aumento (100X). Panel G: Muestra de tejido pulmonar de un cobayo del grupo HT/B utilizada como negativo en la cual se omitió el anticuerpo primario (40X).

Figura 7



Zimografía de extractos de tejido pulmonar.

El análisis de las muestras de tejido pulmonar en geles de poliacrilamida con SDS que tiene incorporada gelatina como sustrato permite revelar la actividad de algunas metaloproteinasas como las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9). En la Figura 8 se muestra un zimograma representativo de tejidos pulmonares de los diferentes grupo experimentales.

El análisis por densitometría mostró que la actividad de MMP-2 total (proMMP-2 + forma activa) aumentó en todos los grupos experimentales respecto al control (**HT**: 2.5; **B**: 2.4; **B+HT**: 3.4 y **HT/B**: 2.9 veces respecto al **C**; $p < 0.01$). Adicionalmente, los grupos que fueron agredidos con humo de tabaco y bleomicina (**B+HT** y **HT/B**) mostraron más actividad de la banda que corresponde a la forma activa de esta enzima (MMP-2).

Por otra parte, también se detectó un aumento significativo en la actividad total de gelatinasa B (MMP-9) en los grupos experimentales respecto al control (**HT**: 4.2; **B**: 2.3; **B+HT**: 4.4 y **HT/B**: 4.4 veces respecto al **C**; $p < 0.01$). Este incremento en la actividad de MMP-9 fue mayor en los grupos que fueron agredidos con humo de tabaco (**HT**, **B+HT** y **HT/B**) y de hecho estos tres grupos mostraron niveles muy similares de actividad tanto de la proenzima y su forma activa.

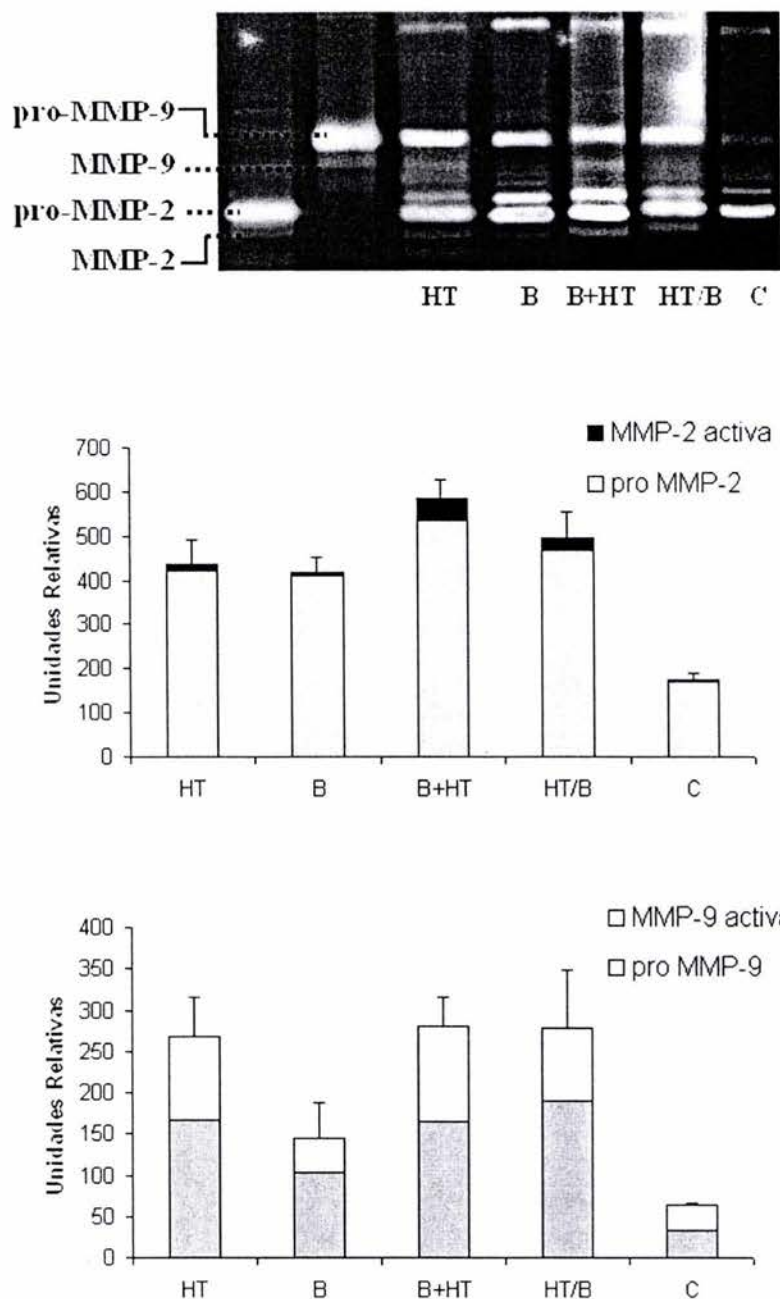


Figura 8. Zimografía de extractos pulmonares en gels SDS-PAGE (8.5%) conteniendo gelatina (1 mg/ml). Muestras representativas de animales expuestos a humo de tabaco (**HT**), animales instilados con bleomicina (**B**), animales instilados con bleomicina y expuestos a humo simultáneamente (**B+HT**), animales expuestos primero a humo y después tratados con bleomicina (**HT/B**) y animales controles (**C**). El medio condicionado sin suero de fibroblastos de pulmón humano se utilizó como marcador positivo para MMP-2 (línea 1) y como marcador positivo para la MMP-9 se utilizó medio condicionado de células U2-OS estimuladas con PMA (línea 2). Las gráficas muestran el resultado del análisis densitométrico de 4 muestras independientes en cada grupo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN .

Los mecanismos por los cuales la exposición a humo de cigarro afecta en una u otra vía la incidencia y la severidad de varias enfermedades intersticiales del pulmón no son completamente claras (54). Asimismo, aunque fumar causa varias alteraciones celulares en las vías aéreas, su papel en la patogénesis de la fibrosis que ocurre en el intersticio pulmonar no ha sido bien establecido. Por ejemplo, aunque se ha reportado que fumar puede ser un factor de riesgo para la fibrosis pulmonar idiopática (59), también puede conferir cierta protección presumiblemente debido a que se reduce la formación de focos de fibroblastos (69, 70) que como se ha establecido son los responsables de sintetizar colágenas y otras proteínas de la matriz extracelular. Adicionalmente, se ha observado que los fumadores crónicos pueden desarrollar en primer lugar enfisema pulmonar y después fibrosis pulmonar de etiología desconocida (71).

En este trabajo nosotros observamos que la exposición a humo de tabaco incrementa el número de miofibroblastos en el intersticio pulmonar y exacerba la respuesta fibrosante pulmonar inducida con bleomicina. Sin embargo, este efecto fue más severo en los cobayos en los cuales la exposición a humo precedió al tratamiento con el agente fibrosante. Es importante enfatizar que este grupo experimental es diferente al otro grupo que también fue agredido con humo de tabaco y bleomicina en el sentido de que los pulmones ya se encontraban dañados por la acción del humo de tabaco cuando esos animales fueron instilados con bleomicina.

En un primer reporte Osanai y col., encontraron que el humo de tabaco reduce la respuesta fibrótica a la bleomicina (72). Sin embargo, este estudio fue hecho en hamsters y esto dificulta una comparación directa con nuestro trabajo que fue en cobayos. A pesar de esto, en ambos

modelos se observó un incremento significativo en el porcentaje de neutrófilos cuando los animales fueron tratados con humo de tabaco y bleomicina. En adición a la diferencia entre especies, en el modelo con hamsters los niveles de exposición a humo de tabaco fueron considerablemente más bajos y los animales fueron estudiados solo 10 días después de ser instilados con bleomicina en contraste con las 6 semanas usadas en nuestro estudio. Quizás la exposición a humo de cigarro en las fases iniciales del daño por bleomicina reduce la fibrosis pero es probable que después de un daño pulmonar prolongado puede llevar a incrementar la fibrosis, tal y como ocurrió en nuestro modelo experimental.

Pueden existir varios mecanismos por los cuales el humo de cigarro incrementa la fibrosis pulmonar y de hecho algunos deben ocurrir por el simple hecho de fumar en si, mientras que otros pudieron aparecer cuando ambas agresiones fueron combinadas. Con respecto a la primer situación, tres eventos que pudieron favorecer la respuesta fibrótica cuando los animales fueron expuestos únicamente a humo de cigarro son: i) un marcado incremento de neutrófilos, ii) un aumento de la actividad de MMP-9 en el pulmón y iii) la presencia de factores fibroproliferativos en el lavado broncoalveolar.

Una respuesta fibrótica más intensa ha sido asociada con la acumulación de neutrófilos en modelos animales y en humanos (73, 74) y el incremento de neutrófilos cargados de MMP-8 y MMP-9 ha sido implicado en la reacción fibrótica de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad crónica (75). Adicionalmente, un estudio reciente en pacientes con neumonía intersticial usual y neumonía intersticial no específica mostró que en ambos casos existe un elevado porcentaje de neutrófilos (76).

La sobre regulación de MMP-9 ha sido previamente documentada en pulmón de humanos fumadores con EPOC así como en cobayos expuestos a humo de cigarro (53, 77) y es muy probable que ahí exista una relación entre el aumento de la actividad de MMP-9 y el

incremento de neutrófilos debido a que estas células inflamatorias son la principal fuente de MMP-9. Por lo tanto, en procesos patológicos en donde los neutrófilos son abundantes, la actividad de MMP-9 también se encuentra incrementada, tal y como nosotros la encontramos en los cobayos expuestos a humo de tabaco. Adicionalmente, MMP-9 es sintetizada por diferentes tipos celulares después del daño pulmonar, incluyendo células del epitelio alveolar y macrófagos (53, 78).

Un número creciente de evidencias experimentales sugieren que el incremento de la actividad de MMP-9 puede contribuir en la fibrogénesis. En este sentido, ratones que carecen de MMP-9^{-/-} desarrollaron lesiones fibróticas menos intensas que los ratones silvestres MMP-9^{+/+} cuando fueron agredidos con bleomicina (79). Así mismo, ratones que carecen de la γ -glutamyl transpeptidasa, una enzima clave en el metabolismo de glutatión y cisteína, desarrollaron una respuesta fibrótica a bleomicina menos intensa, lo cual fue asociado parcialmente con un decremento de neutrófilos y una disminución en la actividad de MMP-9 en el tejido pulmonar (80). Además, se ha observado un incremento de neutrófilos y de la actividad de MMP-9 en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y pacientes con neumonía criptogénica organizada (81).

Considerando la afinidad de la MMP-9 por su sustrato, la colágena tipo IV, el incremento en la actividad de esta enzima puede llevar a la pérdida de la integridad de las membranas basales y a su vez, después de una segunda agresión como la bleomicina, podría incrementar el efecto fibrosante de este agente. Otro probable efecto pro-fibrosante que resulta importante considerar esta relacionado con la capacidad que tiene la MMP-9 localizada en la membrana celular de cortar y activar al TGF- β en su forma latente ya que TGF- β es un potente factor de crecimiento pro-fibrótico (82).

Un tercer mecanismo que posiblemente pueda estar involucrado en que el humo de cigarro incremente la fibrosis pulmonar es el incremento en la tasa de crecimiento de fibroblastos que observamos en el fluido del LBA. Esto fue una sorpresa debido a que existen reportes de que al menos *in vitro*, el extracto del humo de cigarro reduce la viabilidad, la proliferación y la migración de fibroblastos (83, 84).

La caracterización del grupo experimental en el cual nosotros observamos la mayor respuesta fibrótica mostró que en este grupo existe un aumento importante en el porcentaje de eosinófilos en el LBA así como en los niveles de IL-4 y TIMP-2. El análisis por inmunohistoquímica también mostró un incremento de IL-4 y TIMP-2 en el tejido pulmonar de estos animales y estas dos moléculas son expresadas principalmente por macrófagos intersticiales. Interesantemente, existen reportes de que los eosinófilos, L-4 y TIMP-2 pueden desempeñar un papel importante en la respuesta fibrosante. IL-4 es una molécula clave en la respuesta mediada por linfocitos T cooperadores (Th2) que es capaz de generar un medio profibrótico. IL-4 es un potente activador de la síntesis de varias proteínas de la MEC incluyendo colágena (85, 86) y también incrementa la quimiotaxis de fibroblastos (87). Además, IL-4 estimula la proliferación de fibroblastos y esto podría estar contribuyendo al incremento de la actividad estimuladora de crecimiento de fibroblastos que encontramos en el LBA del grupo HT/B. Un punto a favor de esta idea es el hecho de que el uso de un anticuerpo contra IL-4 disminuyó parcialmente la actividad proliferativa obtenida con el LBA de estos animales. Por lo tanto, IL-4 podría estar desempeñando un papel en exagerar la respuesta fibrótica causada por la agresión con humo de tabaco y bleomicina. Otros estudios *in vitro* también favorecen la idea de que IL-4 desempeña un papel profibrosante. Así, el uso de un anticuerpo neutralizante contra IL-4 reduce la fibrosis hepática inducida por *Schistosoma mansoni* en murinos (88). Sin embargo, un estudio reciente pone entre dicho este concepto ya que se encontró que la

severidad de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se reduce en ratones transgénicos que sobre-expresan IL-4 comparando contra los ratones knockout que carecen de esta proteína (89).

Por otro lado, se ha reportado un incremento en la expresión de TIMP-2 en fibrosis pulmonar (90). Esta molécula además de ser un inhibidor de MMP, también es un inductor de proliferación celular de varios tipos celulares incluyendo fibroblastos (91). Adicionalmente, se ha observado que TIMP-2 esta presente en los focos de fibroblastos/miofibroblastos característicos de pulmones con fibrosis pulmonar idiopática (78, 90). Interesantemente, una conexión entre IL-4 y TIMP-2 fue recientemente reportada por Ihn y col. (92) quienes encontraron que IL-4 es capaz de inducir un aumento dosis y tiempo dependiente de TIMP-2, tanto a nivel del mRNA así como en la proteína en fibroblastos de piel, lo cual no ocurre con otras moléculas como TGF- β , oncostatina M o IL-6. En este mismo estudio se determinó que la inducción de TIMP-2 por IL-4 involucra la señalización dependiente de la vía de p38.

Otro de los hallazgos importantes en los cobayos del grupo HT/B fue el notable incremento de eosinófilos en el LBA, un proceso que puede ser parcialmente asociado con el incremento de IL-4 y los eosinófilos han sido asociados en diversas condiciones fibrosantes (93) y se ha observado que actúan como células que pueden modular la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena, en parte, a través del TGF- β (94). Además, un estudio realizado por Zhang *et al.*, (95) mostró la presencia de eosinófilos produciendo TGF- β 1 en áreas de fibrosis activa en un modelo de daño pulmonar inducido con bleomicina. Adicionalmente, la presencia de eosinófilos en el pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar se ha correlacionado con un mal pronostico y con la resistencia a la terapia (96).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la exposición a humo de cigarro puede contribuir a formar un microambiente profibrótico que puede incrementar la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Este efecto podría estar al menos parcialmente relacionado con un incremento de neutrófilos, de MMP-9 y factores con actividad fibroproliferativa. Los cobayos que primero fueron expuestos a humo y que después fueron agredidos con bleomicina desarrollaron una reacción fibrótica más severa la cual fue caracterizada por una respuesta tipo Th2.

REFERENCIAS.

1. Turino, G.M. The lung parenchyma-A dynamic matrix. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985; 132: 1324-1334.
2. Aumailley, M., and Gayraud, B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* 1998; 76: 253-265.
3. Lukashev, M.E., and Werb, Z. ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehavior. *Trends Cell Biol.* 1998; 11: 437-441.
4. Ortega, N., and Werb, Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.* 2002; 115: 4201-4214.
5. Dunsmore, S.E., and Rannels, D.E., Extracellular matrix biology in the lung. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)*. 1996; 270: L3-L37.
6. Myllyharju, J., and Kivirikko, K.I. Collagens and collagen diseases. *Ann. Med.* 2001; 33: 7-21.
7. Brodsky, B., and Ramshaw. J.A.M. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol.* 1997; 15: 545-554.
8. Sannes, P.L., and Wang, J. Basement membranes and pulmonary development. *Exp. Lung Res.* 1997; 23:101-108.
9. Matrisian, L.M. The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays.* 1992; 14: 455-463.
10. McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13: 534-540.
11. Nagase, H., and Woessner. J.F. Jr. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 21491-21494.

12. Murphy, G., and Knäuper, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the “hemopexin” domain? *Matrix Biol.* 1997; 15: 511-518.
13. Vu, T.H., and Werb, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Dev.* 2000; 14: 2123-2133.
14. Sternlicht, M.D., and Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001; 17: 463-516.
15. Hotary, K., Allen, E., Punturieri, A., Yana, I., and Weiss, S.J. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J. Cell Biol.* 2000; 149: 1309-1323.
16. Westermarck, J., and Kähäri, V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999; 13: 781-792.
17. Han, Y.P., Tuan, T.L., Hughes, M., Wu, H., and Garner, W.L. Transforming growth factor- β -and tumor necrosis factor- α -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 22341-22350.
18. Nagase, H., Cawston, T., Dessilva, M., and Barret, A. Identification of plasma kallikrein as an activator of latent collagenase in rheumatoid synovial fluid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982; 702: 133-142.
19. Murphy, G., Cokett, M.I., Stephens, P.E., Smith, B.J., and Docherty, A.J. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.* 1987; 248: 265-268.

20. Morrison, C.J., Butlr, G.S., Bigg, H.F; Roberts, C.R., Soloway, P.D., and Overall, C.M. Cellular activation of MMP-2 (Gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 47402-47410.
21. Baker, A.H., Edwards, D.R., and Murphy, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 2002: 115: 3719-3727.
22. Gómez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, D., and Thorgeirsson, U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 1997; 74: 111-122.
23. Baker, A.H., Zaltsman, A.B., George, S.J., and Newby, A.C. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. *J. Clin. Inv.* 1998; 101: 1478-1487.
24. Nagase, H., and Brew, K. Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res.* 2002: 4: S51.S61.
25. Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* 2002; 295: 2387-2392.
26. Selman, M., Montaña, M., Ramos, C., Vanda, B., Becerril, C., Delgado, J., Sansores, R. Barrios, R., and Pardo, A. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 1996; 271: L734-L743.
27. Ramos, C., Montaña, M., García-Alvarez, J., Ruiz, V., Uhal, B.D., Selman, M., and Pardo, A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2001; 24:591-598.

28. Selman, M. Neumopatias intersticiales difusas. Editorial Médica Panamericana, México. 1996: 11-33.
29. Ryu, J.H., Colby, T.V., and Hartman, T.E. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current concepts. *Mayo Clin. Proc.* 1998; 73:1085-1101.
30. Selman, M., and Pardo, A. Pathogenic mechanism in the development of diffuse pulmonary fibrosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996; 29: 1117-1126.
31. Sheppard, M.N., and Harrison, N.K. Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblasts activation in fibrosing alveolitis. *Thorax.* 1992; 47: 1064-1074.
32. Sato, E., Koyama, S., Masebuchi, T., Takamizawa, A., Kubo, K., Nagai, S., and Izumi, T. Bleomycin stimulates lung epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activities. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 1999; 276: L941-L950.
33. Coker, R.K., and Laurent, G.J. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur. Respir. J.* 1998; 11: 1218-1221
34. Eickelberg, O., Köhler, E., Reichenberg, F., Beertschin, S., Woodtli, T., Erne, P., Perruchod, A.P., and Roth, M. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- β 1 and TGF- β 3. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 1999; 276: L814-L824.
35. Zhang, K., Rekhter, M.D., Gordon, D., and Phan, S.H. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 114-125.

36. Selman, M., King, T.E. Jr., and Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Inter. Med.* 2001; 134:136-151.
37. Pardo, A., and Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002; 34: 1534-1538.
38. Xu, Y.D., Hua, J., Mui, A., O'Connor, R., Grotendorst, G., and Khalil, N. Release of biologically active TGF- β 1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)*. 2003; 285: L527-L539.
39. Katzenstein, A.L.A., and Myers, J.L. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157: 1301:1315.
40. Selman, M., Montaña, M., Ramos, C., and Chapela, R. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*. 1986; 41: 355-359
41. Selman, M., Montaña, M., Ramos, C., Barrios, R., and Perez-Tamayo, R. Experimental pulmonary fibrosis induced by paraquat plus oxygen in rats: A morphologic and biochemical sequential study. *Exp. Mol. Pathol.* 1989; 50: 147-166.
42. 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.
43. O'Connor, C.M., O'Brien, A., Sweeney, E.C., and FitzGerald, M.X. Progress of bleomycin-induced lung fibrosis in rabbits. *Br. J. Exp. Path.* 1986; 67: 461-471.

44. Zhang, H., Gharaee-Kermani, M., Zhnag, K., Karmioli, S., and Phan, S.H. Lung fibroblasts α -smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1996; 148: 527-537.
45. Gharaee-Kermani, M., McGarry, B., Lukascz, M., Huffnagle, G., Egan, R.W., and Phan, S.H. The role of IL-5 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J. Leukoc. Biol.* 1998; 64: 657-666.
46. Kunugi, S., Fukuda, Y., Ishizaki, M., and Yamanaka, N. Role of MMP-2 in alveolar epithelial cell repair after bleomycin administration in rabbits. *Lab. Inv.* 2001; 81: 1309-1318.
47. Pérez-Ramos, J., Segura-Valdez, L., Vanda, B., Selman, M., and Pardo, A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am. J. respir. Crit. Care Med.* 1999; 160: 1274-1282.
48. Zuo, F., Kaminski, N., Eugui, E., Allard, J., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Lollini, L., Morris, D., Kim, Y., DeLustro, B., Sheppard, D., Pardo, A., Selman, M., and Heller, R.A. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 6292-6297.
49. Corbel, M., Caulet-Maugendre, S., Germain, N., Molet, S., Lagente, V., and Boichot, E. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. *J. Pathol.* 2001; 193: 538-545.
50. Snider, G.L. Emphysema: The first two centuries-and beyond. *Am. J. Respir. Dis.* 1992; 132: 417-433.
51. Evans, M.D., and Pryor W.A. Cigarette smoke, emphysema, and damage to α 1-proteinase inhibitor. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 1994; 266: L593-L611.

52. Pardo, A., and Selman, M. Proteinase-antiproteinase imbalance in the pathogenesis of emphysema: The role of metalloproteinases in lung damage. *Histol. Histopathol.* 1999; 14: 227-233.
53. Selman, M., Cisneros-Lira, J., Gaxiola, M., Ramírez R., Kudlacz, E.M. Mitchell, P.G. and Pardo, A. Matrix metalloproteinases inhibition abrogates tobacco smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Chest* 2003; 123: 1633-1641.
54. Murin, S., Smith Biello, K., and Matthay R. Other smoking-affected pulmonary diseases. *Clin. Chest Med.* 2000; 21: 121-137.
55. Johanson, S., Bjermer, L., Franzen, L., and Henriksson, R. Effects of ongoing smoking on the development of radiation-induced pneumonitis in breast cancer and esophagus cancer patients. *Radiother. Oncol.* 1998; 49: 41-47.
56. Nagai, S., Hoshino, Y., Hayashi, M., and Ito. Smoking-related interstitial lung diseases. *Curr. Opin. Pulmonary Med.* 2000; 6: 415-419.
57. Fraig, M., Shreesha, U., Savici, D., and Katzenstein A. Respiratory bronchiolitis: A clinicopathologic study in current smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Am. J. Surg. Pathol.* 2002; 26: 647-653.
58. Ryu, J.H., Colby, T.V., Hartman, T.E., and Vassallo, R. Smoking-related interstitial lung diseases: a concise review. *Eur. Respir. J.* 2001; 122-132.
59. Baumgartner, K.B., Samet, J.M., Stidley, C.A., Colby, T.H., Waldron, J.A., and collaborating centers. Cigarette smoking: A risk factor for the idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155: 242-248.
60. Braun, K.M., Cornish, T., Valm, A., Cundiff, J., Pauly, J., and Fan S. Immunotoxicology of cigarette smoke condensates: suppression of macrophage responsiveness to interferon gamma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998; 149:136-146.

61. Anderson, R., Theron, A.J., Richards, G.A., Myer, M.S., and van Rensburg, A.J. Passive smoking by humans sensitizes circulating neutrophils. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144:570-574.
62. Nishikawa, M., Kakemizu, N., Ito, T., Kudo, M., Kaneko, T., Suzuki, M., Udaka, N., Ikeda, H., and Okubo, T. Superoxide mediates cigarette smoke-induced infiltration of neutrophils onto the airways through nuclear factor- κ B activation and IL-8 mRNA expression in guinea pigs in vivo. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999; 20: 189-198.
63. Takizawa, H., Tanaka, M., Takami, K., Ohtoshi, T., Ito, K., Satoh, M., Okada, Y., Yamasawa, F., Nakahara, K., and Umeda, A. Increased expression of transforming growth factor- β 1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163: 1476-1483.
64. Adesina, A.M., Vallyathan, V., McQuillen, E.N., Weaver, S.O., and Craighead, J.E. Bronchial inflammation and fibrosis associated with smoking. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143: 144-149.
65. Pryor, W.A. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Rad. Biol. Med.* 1992; 13: 659-676.
66. Rahman, X.Y.L., Donaldson, K., and MacNee, W. Mechanism of cigarette smoke induced increased airspace permeability. *Thorax.* 1996; 51: 465-471.
67. Lannan, S., Donaldson, K., Brown, D., and MacNee, W. Effect of cigarette smoke and its condensates on alveolar epithelial cell injury in vitro. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 1994; 266: L92-L100.

68. Woessner, J.F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93: 440-447, 1961.
69. King, T.E. Jr., Schwarz, M.I., Brown, K., Tooze, J.A., Colby, T.V., Waldron, J.A. Jr., Flint, A., Thurlbeck, W., and Cherniack, R.M. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 1025-1032.
70. King, T.E. Jr., Tooze, J.A., Schwarz, M.I., Brown, K., and Cherniack, R.M. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 1171-1181.
71. Hiwatari, N., Shimura, S., and Takihima, T. Pulmonary emphysema followed by pulmonary fibrosis of undetermined cause. *Respiration* 1993; 60: 354-358.
72. Osanai, K., Takahashi, K., Suwabe, A., Takada, K., Ikeda, H., Sato, S., and Yasui, S. The effect of cigarette smoke on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 138: 1276-1281.
73. Cailles, J.B., O'Connor, C., Pantelidis, P., Southcott, A.M., Fitzgerald, M.X., Black, C.M., and du Bois, R.M. Neutrophils activation in fibrosing alveolitis: a comparison of lung cryptogenic fibrosing alveolitis and systemic sclerosis. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 992-999.
74. Jones, H.A., Schofield, J.B., Krausz, T., Boobis, A.R., and Haslett, C. Pulmonary fibrosis correlates with the duration of tissue neutrophil activation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158: 620-628.
75. Pardo, A., Barrios, R., Gaxiola, M., Segura-Valdez, L., Carrillo, G., Estrada, A., Mejía, M., and Selman, M. Increase of lung neutrophils and upregulation of neutrophil

- gelatinase B and collagenase in hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 1698-1704.
76. Veeraraghavan, S., Latsi, P.I., Wells, A.U., Pantelidis, P., Nicholson, A.G., Colby, T.V., Haslam, P.L., Renzoni, E.A., and du Bois, R.M. BAL findings in idiopathic nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia. *Eur, Respir. J.* 2003; 22: 239-244.
77. Segura, L., Pardo, A., Gaxiola, M., Uhal, B.D., Becerril, C., and Selman, M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *CHEST* 2000; 117: 684-694.
78. Selman, M., Ruiz, V., Cabrera, S., Segura, L., Ramírez, R., Barrios, B., 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.
79. Betsuyaku, T., Fukuda, Y., Parks, W.C. Shipley, J.M. and Senior, R.M. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am. J. Pathol.* 2000; 157: 525-535.
80. Pardo, A., Ruiz, V., Arreola, J.L., Ramírez, R., Cisneros-Lira, J., Gaxiola, M., Barrios, R., Kala, S.V., Lieberman, M.W., and Selman, M. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167: 925-932.
81. Choi, K.H., Lee, H.B., Jeong, M.Y., Rhee, Y.K. Chung, M.J., Kwak, Y.G., and Lee, Y.C. The role of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in cryptogenic organizing pneumonia. *CHEST* 2002; 121: 1478-1485.

82. Yu, Q., and Stamenkovic, I., Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14: 163-176.
83. Ishii, T., Matsuse, T., Igarashi, H., Masuda, M., Teramoto, S., and Ouchi, Y. Tobacco smoke reduced viability in human lung fibroblasts: the protective effect of glutathione S-transferase P1. *Am. J. Physiol.* 2001; 280: L1189-L1195.
84. Nobukuni, S., Watanabe, K., Inoue, J., Wen, F.Q., Tamaru, N., and Yoshida, M. Cigarette smoke inhibits the growth of lung fibroblasts from patients with pulmonary emphysema. *Respirology* 2002; 7: 217-223.
85. Gillery, P., Fertin, C., Nicolas, J.F., Chastang, F., Kalis, B., Banchereau, J., and Marquart, F.X. Interleukin-4 stimulates collagen gene expression in human dermal fibroblasts monolayer culture. Potential role in fibrosis. *FEBS Lett.* 1992; 302: 231-234.
86. Postlethwaite, A.E., Holness, M.A., Katai, H., and Raghow, R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix protein in response to interleukin 4. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 1479-1485.
87. Postlethwaite, A.E., and Seyer, J.M. Fibroblasts chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4: identification by synthetic peptide analysis of two chemotactic domains residing in amino acid sequences 70-88, and 89-122. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 2147-2152.
88. Heever, A.W., Williams, M.E., Wynn, T.A., Finkelman, F.D., Seder, R.A., Cox, T.M. Hieny, S., Caspar, P., and Sher, A. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2

- cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J. Immunol.* 1994; 153: 753-759.
89. Izbicki, G., Or, R., Christensen, T.G., Segel, M.J., Fine, A., Goldstein, R.H., and Breuer, R. Bleomycin-induced lung fibrosis in IL-4-overexpressing and Knockout mice. *Am. J. Physiol.* 2002; 283: L1110-L1116.
90. 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 disease. *Lab. Invest.* 1998; 78: 687-698.
91. Nemeth, J.A., Rafe, A., Steiner, M., and Goolsby, C.L. TIMP-2 growth-stimulatory activity: a concentration-and cell type-specific response in the presence of insulin. *Exp. Cell Res.* 1996; 224: 110-115.
92. Ihn, H., Yamane, K., Asano, Y., Kubo, M., and Tamaki, K. IL-4 up-regulates the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in dermal fibroblasts via the p38 mitogen-activated protein-kinase-dependent pathway. *J. Immunol.* 2002; 168: 1895-1902.
93. Noguchi, H., Kephart, G.M., Colby, T.V., and Gleich, G.J. Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1992; 140: 521-528.
94. Levi-Schaffer, F., Garbuzenko, E., Rubin, A., Reich, R., Pickholz, D., Gillery, P., Emonard, H., Nagler, A., and Marquart, F.A. Human eosinophils regulate human lung and skin-derived fibroblasts properties in vitro: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 9660-9665.

95. Zhang, K., Flanders, K.C., and Phan, S.H. Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1995; 147: 352-361.
96. Boomars, K.A., Wagenaar, S.S., Mulder, P.G.H., Velzen-Blad, H., and van den Bosch, J.M.M. Relationship between cells obtained by bronchoalveolar lavage and survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1995; 50: 1087-1092.

APENDICE.

Artículos publicados.

Cigarette smoke exposure potentiates bleomycin-induced lung fibrosis in guinea pigs

José Cisneros-Lira,^{1,2} Miguel Gaxiola,² Carlos Ramos,² Moisés Selman,² and Annie Pardo¹

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Mexico City 04000; and ²Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan 4502, Mexico City, Mexico

Submitted 13 March 2003; accepted in final form 30 June 2003

Cisneros-Lira, José, Miguel Gaxiola, Carlos Ramos, Moisés Selman, and Annie Pardo. Cigarette smoke exposure potentiates bleomycin-induced lung fibrosis in guinea pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L949–L956, 2003. First published July 3, 2003; 10.1152/ajplung.00074.2003.—The role of tobacco smoking in the development and outcome of pulmonary fibrosis is uncertain. To approach the effects of cigarette smoke on bleomycin-induced lung fibrosis, we studied five groups of guinea pigs: 1) controls, 2) instilled with bleomycin (B), 3) exposed to tobacco smoke for 6 wk (TS), 4) bleomycin instillation plus tobacco smoke exposure for 6 wk (B+TS), and 5) tobacco smoke exposure for 6 wk and bleomycin after smoking (TS/B). Guinea pigs receiving bleomycin and tobacco smoke exposure exhibited higher fibrotic lesions including a significant increase in the number of positive α -smooth muscle actin cells compared with bleomycin alone (B+TS, $3.4 \pm 1.2\%$; TS/B, $3.7 \pm 1.5\%$; B, $2.3 \pm 1.5\%$; $P < 0.01$). However, only the TS/B group reached a significant increase in lung collagen compared with the bleomycin group (TS/B, 3.5 ± 0.7 ; B + TS, 2.9 ± 0.4 ; B, 2.4 ± 0.2 mg hydroxyproline/lung; $P < 0.01$). Bronchoalveolar lavage (BAL) from TS/B showed an increased number of eosinophils and higher levels of IL-4 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 ($P < 0.01$ for all comparisons) and induced a significant increase in fibroblast proliferation ($P < 0.05$). Importantly, smoke exposure alone induced an increase in BAL neutrophils, matrix metalloproteinase-9, and fibroblast proliferation compared with controls, suggesting that tobacco smoke creates a profibrotic milieu that may contribute to the increased bleomycin-induced fibrosis.

matrix metalloproteinase-9; fibroblast proliferation; interleukin-4; tissue inhibitor of metalloproteinase-2; pulmonary fibrosis

PULMONARY FIBROSIS is the final common pathway of a variety of disorders affecting the lung parenchyma and grouped as interstitial lung diseases (ILD) (39). Cigarette smoking, a leading cause of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), also exerts an effect on parenchymal lung inflammation and fibrosis. Thus it may promote or inhibit these pathological processes, and, in turn, it may influence the incidence, severity, or natural history of a wide array of ILD (25). For example, it is strongly associated with some diseases that seem to be likely caused by smoking, such as respiratory bronchiolitis-associated ILD, desquamative inter-

stitial pneumonia, and pulmonary histiocytosis X (25, 26, 47, 49). Likewise, current and former smokers show an increased risk for developing idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), although smokers appear to have a better survival rate than nonsmokers (3, 21). By contrast, cigarette smoking seems to have a protective effect on the development of hypersensitivity pneumonitis, a lymphocytic alveolitis provoked by the exposure to organic particles, and sarcoidosis, an inflammatory disorder of unknown etiology (10, 11, 25, 41). In addition, a number of clinical and experimental studies suggest that cigarette smoking reduces the frequency of radiation-induced pneumonitis (18, 28).

The mechanisms by which cigarette smoking affects in one or another way the inflammatory and fibrotic responses of the lung remain to be elucidated. Cigarette smoke seems on one hand to suppress some macrophage activities but, on the other, to promote systemic priming of neutrophils (2, 6).

Tobacco smoke may participate in lung remodeling by increasing the expression of a number of cytokines and by inducing the release of profibrotic growth factors bound to extracellular matrix through the increase of the expression of matrix metalloproteinases (MMP) (24).

It has been shown that epithelial cells from small airways of smokers and COPD patients highly express transforming growth factor (TGF)- β 1 mRNA and protein (46). This finding may contribute to the fibrotic reaction in targets areas of the lungs. Thus, in a study comparing smokers and nonsmoking males of various ages who died suddenly, it was found that bronchiolar inflammatory changes were evident in smokers of all ages, and bronchiolar fibrosis was clearly associated with chronic cigarette use, both lesions occurring independently of emphysema (1).

An important consideration in the putative interactions between cigarette smoking and incidence or course of an ILD is related with the timing relationship between tobacco smoke exposure and the fibrogenic injury. In this context, the aim of this study was to examine the effect of previous and simultaneous sidestream cigarette smoking on bleomycin-induced lung fibrosis in guinea pigs.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Address for reprint requests and other correspondence: A. Pardo, Facultad de Ciencias, UNAM, Apartado Postal 21-630, Coyoacan México DF, 04000, Mexico (E-mail: aps@hp.fciencias.unam.mx).

MATERIALS AND METHODS

Tobacco smoke and bleomycin exposure. Guinea pigs (~400 g) were exposed to the smoke of 20 filtered commercial cigarettes (Marlboro 100, Cigatam SA de CV, Mexico; Philip Morris Products) per day, 5 days/wk for 6 wk as previously described (43). Bleomycin (3 units; Bristol-Myers, Syracuse, NY) was administered by single intratracheal instillation.

Experimental design. Five groups of guinea pigs were studied: 1) treated with bleomycin and killed 6 wk after (B); 2) exposed to tobacco smoke for 6 wk and killed after treatment (TS); 3) instilled with bleomycin and then exposed to tobacco smoke during 6 wk (B+TS); 4) exposed first to tobacco smoke for 6 wk and then instilled with bleomycin and killed 6 wk after (TS/B); and 5) control age-matched guinea pigs exposed to room air and instilled with saline solution (C). The Committee on Use and Care of Animals from the National Institute of Respiratory Diseases approved the protocol.

Eight animals from each group were anesthetized with 50 mg/kg ip pentobarbital sodium, and lungs were obtained for histology and hydroxyproline quantification.

Histology. Lungs were lavaged with saline solution through the main pulmonary artery, and the right lung was removed and inflated with 4% paraformaldehyde at continuous pressure of 25 cmH₂O. Tissues were embedded in paraffin and processed for conventional light microscopy and immunohistochemistry. The whole left lung was removed and homogenized in 10 ml of PBS, and aliquots (1 ml) of lung homogenates were kept at -80°C until used.

Hydroxyproline measurement. Left lungs from eight guinea pigs of each group were analyzed for hydroxyproline content as an estimate of collagen content. Aliquots of 1 ml of homogenate were hydrolyzed in 1 ml of 12 N HCl for 24 h at 110°C, and hydroxyproline colorimetric analysis was performed as described by Woessner (48). All assays were done in triplicate, and data are expressed as micrograms of hydroxyproline per lung.

Bronchoalveolar lavage. In a parallel experiment, left lungs from six animals of each group were lavaged through a tracheal cannula with three aliquots of 5 ml of sterile saline solution at 37°C. The bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was centrifuged at 400 g for 10 min at 4°C, and the supernatant was kept at -80°C until use. The pellet was resuspended in PBS and used for total cell count. Differential cell counting was performed after fixation with 50% ethyl alcohol and 2% Carbowax (50% polyethylene glycol) in slides stained with hematoxylin and eosin. Recovered fluid was used to evaluate fibroblast proliferation, IL-4, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2, and cell profile. Right lungs were used for zymography.

Lung tissue zymography. Lung samples (25 mg/ml) were homogenized in 10 mM 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 20 mM HEPES (pH 7.5), and 150 mM NaCl and then centrifuged at 9,500 g for 20 min at 4°C. Lung supernatants containing 15 µg of protein were analyzed by SDS-PAGE gels (8.5%) containing gelatin (1 mg/ml) and a final concentration of 0.3 mg/ml heparin (51). Serum-free conditioned medium from human lung fibroblasts was used as an MMP-2 marker, and conditioned medium from PMA-stimulated human osteogenic sarcoma bone [U2-OS cells from American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD] was utilized as an MMP-9 marker.

Quantification of IL-4 and TIMP-2 in BAL fluid. BAL fluid samples from six animals of the several groups were 4× concentrated, and IL-4 concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the kit Quantikine HS (R&D Systems, Minneapolis, MN) according

to the manufacturer's instructions. Levels of TIMP-2 were determined in the same samples by a human ELISA system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) that can detect TIMP-2 from guinea pigs. The assays were performed in quadruplicate.

Lung fibroblast growth rate. Guinea pig lung fibroblast cell line JH4 was purchased from ATCC. Fibroblasts (passages 5-8) were cultured in T-25 cm² Falcon flasks with Ham's F-12 medium (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO-BRL), 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin at 37°C in 5% CO₂-95% air. Fibroblasts were plated in 96-well culture plates at a cell density of 7 × 10³ cells/well under the same culture conditions and, after 12 h, replaced with new medium plus 1% FBS alone or with 1% FBS and 20% of 4× concentrated and sterilized (PVDF 0.22-µm Millex-GV; Millipore, Molsheim, France) BAL fluid from control or experimental guinea pigs. After 96 h, cell growth was determined with the cell proliferation reagent WST-1 (Boehringer Mannheim) as previously described (37). Absorbance was measured with an ELISA plate reader at a wavelength of 450 nm using a reference wavelength of 620 nm. Absorbance changes were taken as percentage of growth rate increase related to basal values (*day 0*). All assays were performed in sixuplicate. To analyze inhibition of cell proliferation, we ran a parallel experiment using anti-IL-4 neutralizing antibody (R&D Systems).

Immunohistochemistry. Sections were incubated with monoclonal mouse anti-human α-smooth muscle actin (SMA; DAKO, Carpinteria, CA), anti-human TIMP-2 (Oncogene, San Diego, CA), and anti-human IL-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 4°C overnight. A secondary biotinylated anti-immunoglobulin followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) was used according to the manufacturer. 3-Amino-9-ethylcarbazole (BioGenex) was used as substrate (44). The primary antibody was replaced by nonimmune serum for negative control slides. In addition, we determined the number of α-SMA-positive cells in lung sections of B, B+TS, and TS/B animals by evaluating 20 fields of fibrotic and inflammatory sections.

Evaluation of α-SMA. The ratio of α-SMA-positive cells in lung sections of B, B+TS, and TS/B animals was determined in 20 fields of fibrotic and inflammatory sections from six animals in each group. Photographs were taken with a ×40 objective on a Nikon Eclipse E600 interfaced to a Sony SSC-DC54A digital camera system. Each image was processed into the image analysis program MetaMorph 4.5 (Universal Imaging). A threshold was set automatically, and total cell number in each image was determined by nuclei counts, then a new threshold was set on the positive-staining cells, and smooth muscle cells of the bronchioles, blood vessels, and alveolar rings were manually removed from the data set. Approximately the same number of cells was counted for all slides (3,304-4,074).

Statistical analysis. All values are expressed as means ± SD. Differences between means values were assayed by a one-way analysis of variance, using Tukey's method.

RESULTS

Lung histopathology and α-SMA-positive cells. Lung tissue sections were prepared for immunohistochemistry using α-SMA antibody and counterstained with hematoxylin to appreciate tissue architecture. As shown in Fig. 1, control animals exhibited normal parenchymal histology, and α-SMA-positive cells were

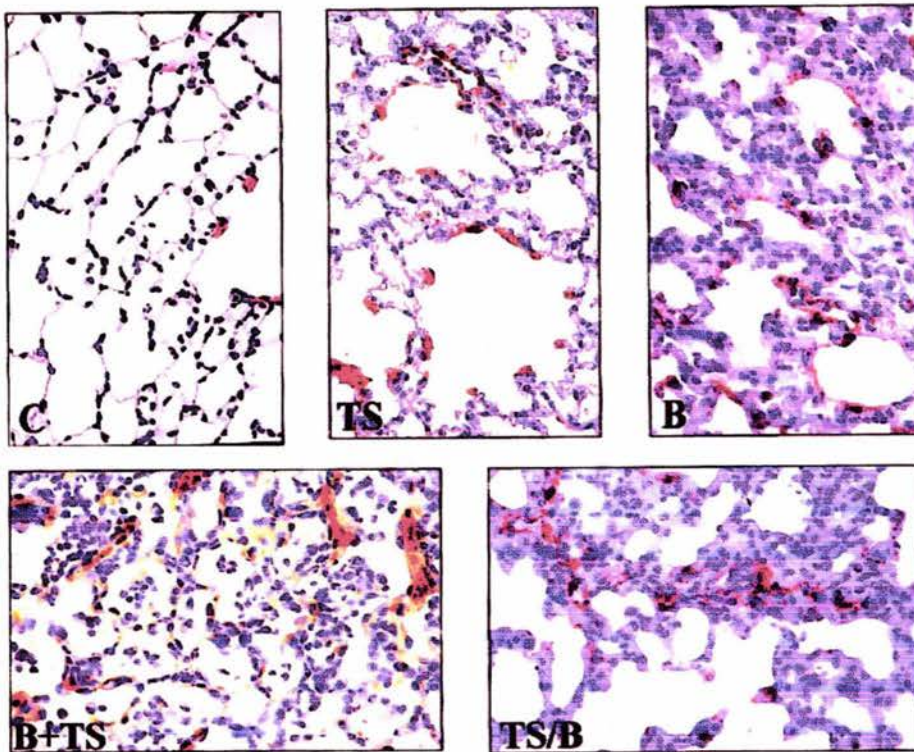


Fig. 1. Photomicrographs of guinea pig lung tissue sections in which immunoreactive α -smooth muscle actin (SMA) was revealed by 3-amino-9-ethyl-carbazole and counterstained with hematoxylin. C, control lungs; TS, exposure to tobacco smoke for 6 wk; B, bleomycin-treated guinea pigs killed after 6 wk. B+TS, bleomycin instillation plus tobacco smoke exposure during 6 wk. TS/B, tobacco smoke exposure for 6 wk and then bleomycin instillation. Original magnification, $\times 40$. The photomicrographs are representative of 6 animals from each experimental group and were selected to illustrate the extent and pattern of lung alveolar inflammation and fibrosis and the α -SMA staining.

apparent in alveolar rings. Lungs from guinea pigs exposed to tobacco smoke showed a moderate peribronchiolar, alveolar, and interstitial inflammation consisting mostly of mononuclear cells and some areas with mild to moderate emphysematous lesions. As in controls, in these animals α -SMA-positive cells were mainly located in smooth muscle cells from vessels and in alveolar rings. At 6 wk after bleomycin instillation, the lungs displayed focal areas of inflammation and interstitial fibrosis, with the presence of α -SMA-positive cells in areas of thickened alveolar septa. Guinea pigs in the B+TS group showed a more evident loss of lung architecture with large zones of inflammation and interstitial fibrosis where an increased number of α -SMA-positive cells was apparent. In guinea pigs that were exposed to cigarette smoking first and then to bleomycin (TS/B), there was a more severe inflammatory and fibrotic lesion and numerous α -SMA-positive cells in the areas of fibrosis.

We determined the ratio of α -SMA-positive cells per 100 cells in lung sections of B, B+TS, and TS/B animals by digital imaging, counting 20 fields of fibrotic and inflammatory sections from six animals in each group. Lungs from both groups that were exposed to tobacco smoke and bleomycin exhibited a significant increase in the number of these cells compared with animals treated only with bleomycin (TS/B, $3.7 \pm 1.5\%$; B+TS, $3.4 \pm 1.2\%$ vs. B, $2.3 \pm 1.5\%$; $P < 0.01$).

Lung hydroxyproline content. Lung collagen was quantified by measuring hydroxyproline content (Fig. 2). Lungs from TS guinea pigs did not show differences with controls (1.4 ± 0.2 vs. 1.2 ± 0.2 mg hydroxypro-

line/lung). At 6 wk after bleomycin instillation, a significant increase in lung hydroxyproline was noticed in all three groups receiving bleomycin when compared with controls (B, 2.4 ± 0.2 ; B+TS, 2.9 ± 0.4 ; TS/B, 3.5 ± 0.7 mg/lung vs. 1.2 ± 0.2 mg/lung from C; $P < 0.01$). When these three groups were compared, a significant increase in lung hydroxyproline was found in those guinea pigs that received tobacco smoke first and bleomycin after, compared with the group that received bleomycin alone (3.5 ± 0.7 vs. 2.4 ± 0.2 mg/lung; $P < 0.01$).

BAL cell profile. Results of cell profile analysis from BAL are shown in Fig. 3. A significant increase in the

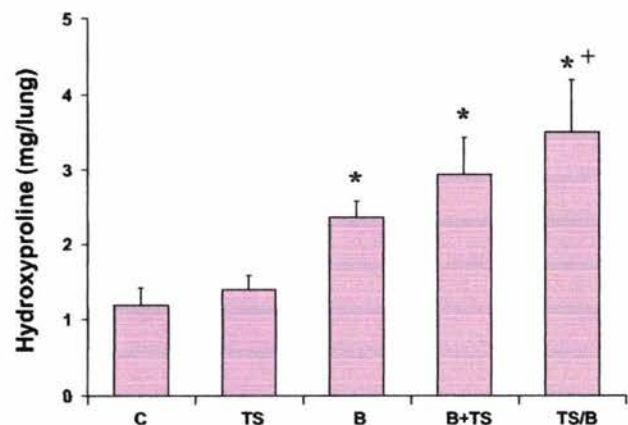


Fig. 2. Effect of tobacco smoke and/or bleomycin instillation on lung hydroxyproline. * $P < 0.01$ compared with control; + $P < 0.01$ compared with the other 2 groups that received bleomycin.

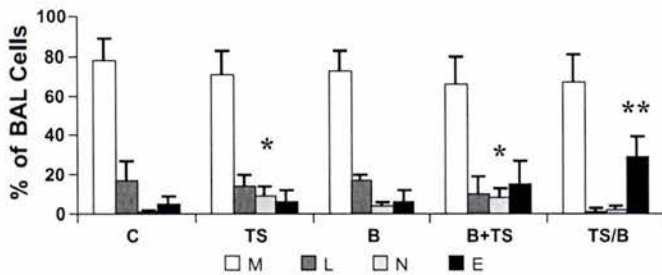


Fig. 3. Cellular profile in the bronchoalveolar lavage (BAL) of control animals (C) and animals exposed to tobacco smoke (TS), bleomycin (B), bleomycin plus tobacco smoke (B+TS), and tobacco smoke first and bleomycin treatment after (TS/B). M, macrophages; L, lymphocytes; N, neutrophils; E, eosinophils. * $P < 0.05$ for neutrophils compared with all other groups; ** $P < 0.05$ for eosinophils compared with all the groups.

percentage of neutrophils was observed in TS and B+TS compared with C (9.5 ± 4.9 , 8 ± 4.8 , and $0.8 \pm 0.8\%$, respectively; $P < 0.05$). The group receiving first tobacco smoke and then bleomycin revealed a significant increase in the percentage of eosinophils (TS/B, $29.7 \pm 10\%$; B+TS, $15.4 \pm 12\%$; B, $6.1 \pm 6.0\%$; TS, $6.2 \pm 5.9\%$; and C, $4.8 \pm 4.4\%$; $P < 0.05$).

Fibroblasts growth rate. To determine whether BAL fluid derived from the different experimental groups had an effect on lung guinea pig fibroblast growth rate, we determined cell number 96 h after BAL fluid exposure, using the cell proliferation reagent WST-1.

As shown in Fig. 4, fibroblasts incubated with BAL from control animals exhibited a $6.3 \pm 1.2\%$ increase in growth rate over fibroblasts in presence of 1% FBS. When cells were incubated with BAL derived from the different experimental groups (TS, B, B+TS, and TS/B), all of them displayed significant increases in growth rate compared with control (TS, $53.8 \pm 1.8\%$; B, $50.6 \pm 4.5\%$; B+TS, $66.6 \pm 2.6\%$; TS/B, $83.4 \pm 4.6\%$; $P < 0.05$). In addition, BAL from TS/B displayed a significant increase compared with tobacco smoke or bleomycin alone ($P < 0.01$). Anti-IL-4 antibody significantly inhibited cell proliferation in the TS/B group ($62.7 \pm 3.4\%$, $P < 0.01$).

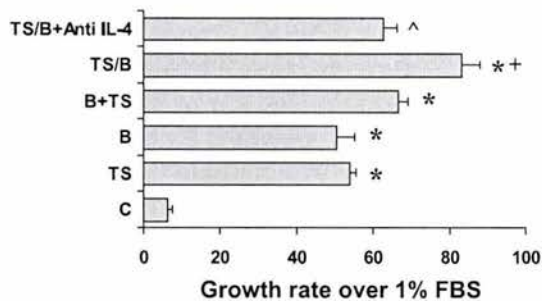


Fig. 4. Growth rate analysis estimated by WST-1 assay from guinea pig lung fibroblasts after 4 days incubation in Ham's nutrient medium supplemented with 1% FCS and 20% of 4 \times concentrated BAL from C, TS, B, B+TS, TS/B, and TS/B with anti-IL-4 neutralizing antibody (TS/B+Anti IL-4). Results are expressed as means \pm SD. * $P < 0.05$ compared with control; + $P < 0.01$ compared with TS and B; ^ $P < 0.01$ compared with TS/B.

IL-4 and TIMP-2 in BAL fluid. ELISA was performed to determine whether protein levels of chemokines/cytokines were present in BAL fluids that might be associated with fibroblast proliferation. From the several molecules analyzed, only IL-4 and TIMP-2 revealed some differences among the groups tested. As shown in Fig. 5A, there was a significant increase in IL-4 levels in TS/B when all the groups are compared [18.1 ± 5.5 (TS/B) vs. 12.4 ± 1.9 (C); 11.2 ± 2.8 (TS); 8.3 ± 2.7 (B) and 11.3 ± 2.7 (B+TS) pg/mg protein; $P < 0.05$].

Figure 5B shows the results of TIMP-2. A significant increase in BAL fluid TIMP-2 levels was observed in the TS/B group (213.8 ± 53.5 ng/mg protein) compared with the other groups, in which TIMP-2 exhibited very similar values (72.3 ± 5.1 in C, 68.3 ± 13.4 in TS, 80.7 ± 9.2 in B, and 107.1 ± 14.6 in B+TS; $P < 0.01$).

Immunolocalization of IL-4 and TIMP-2. To examine the cell source of IL-4 and TIMP-2, we evaluated the expression of the immunoreactive proteins in control guinea pigs and in those exposed to bleomycin alone and to tobacco smoke and bleomycin. As illustrated in Fig. 6, IL-4 and TIMP-2 are mainly expressed by interstitial and alveolar macrophages in bleomycin-instilled animals (Fig. 6, C and D) as well as in TS/B lungs (Fig. 6, E and F). Normal lungs were usually negative, as exemplified in Fig. 6, A and B, for IL-4 and TIMP-2, respectively. Samples incubated with nonimmune serum were negative as shown in Fig. 6G.

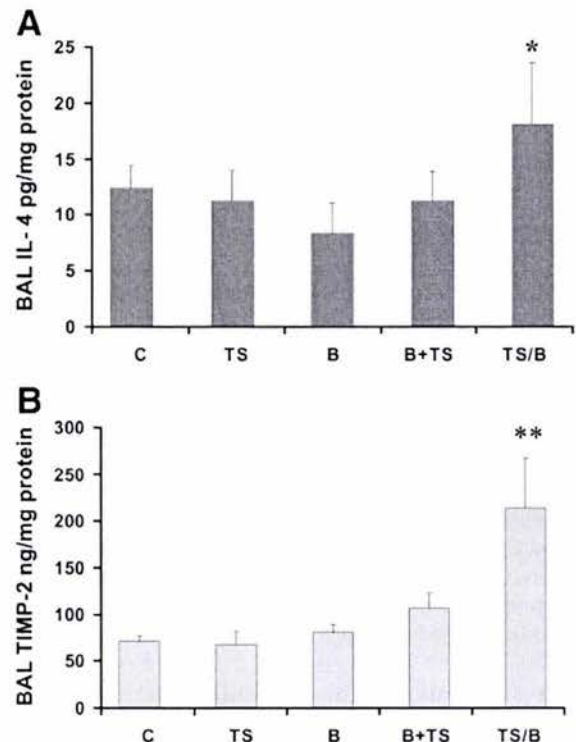


Fig. 5. Levels of IL-4 (A) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 (B) in BAL fluid. IL-4 and TIMP-2 were determined by ELISA in C, TS, B, B+TS, and TS/B animals. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. The data represent the means \pm SD of 5 different animals.

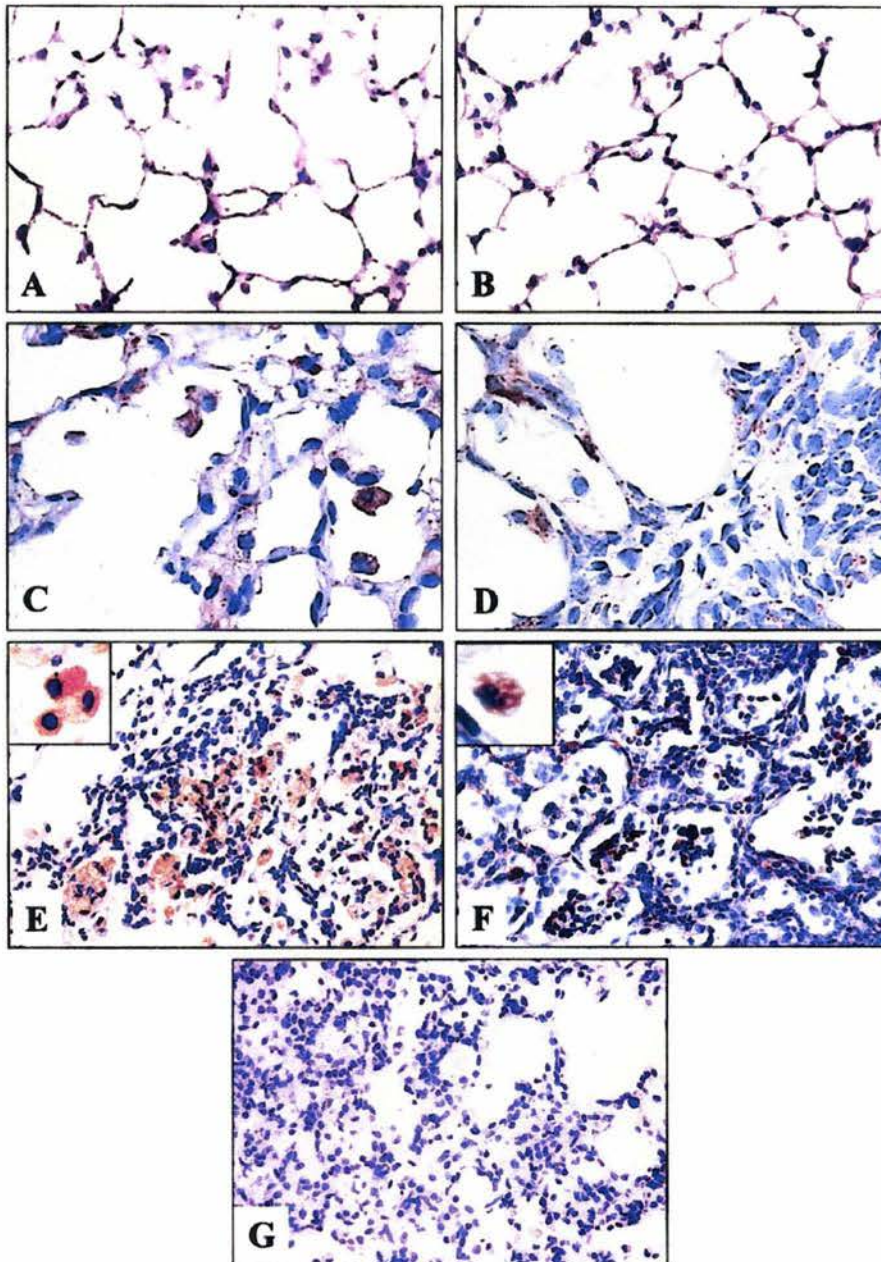


Fig. 6. Localization of IL-4 and TIMP-2 in guinea pig lung samples of bleomycin alone (*C* and *D*)- and tobacco smoke-exposed guinea pigs then treated with bleomycin (*E* and *F*). Immunoreactive proteins were revealed with 3-amino-9-ethyl-carbazole, and samples were counterstained with hematoxylin. *A*: control lung for IL-4. *B*: control lung for TIMP-2. *C*: IL-4-labeled macrophages (original magnification, $\times 60$). *D*: TIMP-2 labeled in macrophages (original magnification, $\times 60$). *E*: numerous IL-4-labeled macrophages (original magnification, $\times 40$); inset at high-power magnification ($\times 100$). *F*: immunoreactive TIMP-2-positive-stained alveolar macrophages ($\times 40$); inset, $\times 100$. *G*: negative control section from a guinea pig lung sample of TS/B in which the primary antibody was omitted ($\times 40$).

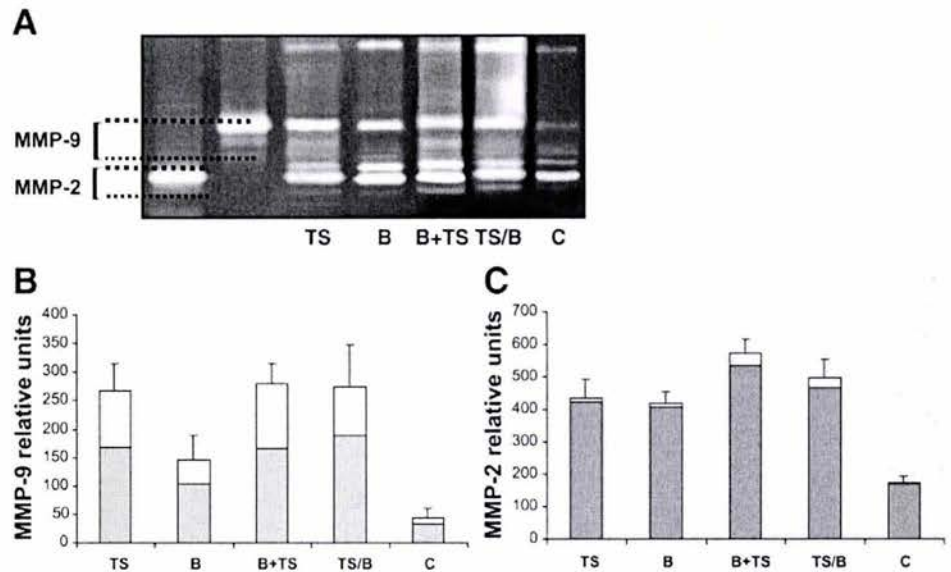
Lung tissue zymography. To analyze gelatinases activity, we examined lung tissues obtained from controls and experimental groups by gelatin zymography. A representative sample per group and a densitometric quantification of the surface and intensity of the lysis bands of zymograms derived from four different animals in each group are illustrated in Fig. 7. Total MMP-9, representing pro-MMP-9 and its lower-molecular-weight active form, was increased about threefold in lung samples from bleomycin group compared with control and about sixfold in the three experimental groups that were exposed to tobacco smoke. An active MMP-9 band represented ~ 23 – 41% of total MMP-9 and was more highly present in the groups receiving

tobacco smoke at the time of death (TS and TS+B). Likewise, total MMP-2 was increased two- to threefold in lung samples from all experimental groups compared with control. The active lower-molecular-weight form represented 2–7% of total MMP-2 lysis bands.

DISCUSSION

The mechanisms by which exposure to cigarette smoking affects in one way or another the incidence or severity of various interstitial lung diseases are not entirely clear (25). Likewise, although smoking causes a number of cellular alterations in the airways, its role in parenchymal lung fibrogenesis has not been pre-

Fig. 7. Identification of gelatinolytic activities in lung tissues. Supernatants from a representative sample from lung tissue extracts from experimental and control animals were resolved by SDS-PAGE gels (8.5%) containing gelatin (1 mg/ml) and a final concentration of 0.3 mg/ml heparin. A: serum-free conditioned medium from human lung fibroblasts was used as matrix metalloproteinase (MMP)-2 marker (lane 1), and conditioned medium from PMA-stimulated U2-OS cells was utilized as MMP-9 marker (lane 2). B and C: densitometric analysis of 4 animals in each group is shown for MMP-9 and MMP-2 in the graphics. White fractions in the bars represent active MMPs, and the gray fractions represent the proenzyme form.



cisely determined. Thus, for example, although smoking seems to be a risk factor for IPF (3), it appears to confer some protection for survival, putatively because it reduces fibroblastic foci (20, 21). Furthermore, heavy smokers may develop first pulmonary emphysema and then pulmonary fibrosis of unknown etiology (14).

In this work, we observed that tobacco smoke exposure increased the number of myofibroblasts in the alveolar septa and exacerbated the lung fibrotic response to bleomycin. However, this effect was more severe in guinea pigs where smoking preceded the exposure to the fibrogenic injuring agent. It is important to emphasize that this experimental group is different from the other that also received tobacco smoke and bleomycin in the fact that the lungs were already injured when they received the bleomycin.

An earlier report by Osanai et al. (32) found that tobacco smoke reduced the fibrotic response to bleomycin. However, this study was performed on hamsters and is difficult to compare directly with ours, which is on guinea pigs. Both our model and the hamster model exhibited statistically significant increases in the neutrophil counts when animals were treated with tobacco smoke and bleomycin. In addition to the species difference, in the hamster model, considerably lower levels of tobacco exposure were used, and animals were studied only 10 days after bleomycin instillation in contrast to the 6 wk used in our study. Perhaps, cigarette smoke in the early phases of bleomycin injury reduces the fibrosis but after prolonged injury leads to increasing damage and increasing fibrosis.

Several mechanisms may account for the smoke-related increase of fibrosis, some occurring by smoking itself whereas others appeared when both aggressions were combined. Regarding the first situation, three events that may enhance a fibrotic response took place when animals were exposed to cigarette smoke alone: 1) a noteworthy increase in neutrophils, 2) an increase in MMP-9 lung activity, and 3) the presence of fibroproliferative factors in BAL.

A higher fibrotic response has been associated with marked accumulation of neutrophils, both in experimental models and human diseases (8, 19), and increased tissue neutrophils loaded with MMP-8 and MMP-9 have been implicated in the fibrotic reaction of patients with chronic hypersensitivity pneumonitis (33).

Upregulation of MMP-9 has been previously documented in human lungs from smokers with COPD as well as in guinea pigs exposed to cigarette smoke (40, 42). There might be a linkage between elevation in MMP-9 activity and increased neutrophils since these inflammatory cells are a major source of MMP-9. Therefore, in pathological processes where neutrophils are abundant, as we found in the BAL of tobacco smoke-exposed guinea pigs, increased MMP-9 is also found. Additionally, MMP-9 is synthesized by a number of different lung cells after injury, including alveolar epithelial cells and macrophages (42, 44). A growing body of evidence strongly suggests that increased MMP-9 activity may contribute to fibrogenesis. MMP-9-deficient mice injured with bleomycin develop considerably fewer lung fibrotic lesions compared with MMP-9^{+/+} littermates (4). Likewise, mice deficient in γ -glutamyl transpeptidase, a key enzyme in glutathione and cysteine metabolism, developed a markedly lesser fibrotic response to bleomycin, which was at least partially associated with decreased neutrophils and lower MMP-9 activity in lung tissues (34).

Considering its substrate affinity for type IV collagen, increased MMP-9 activity may lead to the loss of integrity of the basement membranes, which in turn, after a second injury such as bleomycin exposure, could enhance its fibrogenic effect. Another important putative profibrotic effect is related to the ability of cell surface-localized MMP-9 to cleave and activate latent TGF- β , a potent profibrotic growth factor (50).

A third possible mechanism that may be involved in the cigarette smoke enhancement of lung fibrosis is the increased fibroblast growth rate activity observed in

the BAL fluid. This was a surprising finding, since, at least in vitro, cigarette smoke extracts reduce viability and inhibit fibroblast proliferation and migration (16, 27, 29).

The characterization of the experimental group with the highest fibrotic response shows that this group displayed an important increase in BAL eosinophils as well as in IL-4 and TIMP-2. IL-4 and TIMP-2 were also found to be increased in the injured lung tissues primarily expressed by interstitial and alveolar macrophages. Both molecules and eosinophils have been documented to play an important role in fibrotic response. IL-4 is a pivotal molecule in the T lymphocyte helper 2 (Th2) response that is able to provoke a profibrotic milieu. IL-4 is a potent activator of the synthesis of a number of extracellular matrix proteins, including collagen and tenascin (13, 23, 35, 45), and also increases fibroblast chemotaxis (36). Furthermore, IL-4 stimulates fibroblast proliferation, and it could have contributed to the further increase of fibroblast proliferation stimulating activity found in the BAL fluid of the TS/B group. Supporting this notion, the use of anti-IL-4 antibody partially decreased the proliferating activity obtained in the BAL fluid of these animals. Therefore, IL-4 could have played a role in the exaggerated lung fibrotic repair caused by smoking and bleomycin. Studies in vivo also support a profibrogenic role for IL-4. Thus the use of neutralizing anti-IL-4 antibodies reduces murine *Schistosoma mansoni*-induced hepatic fibrosis and scleroderma (9, 31). However, a recent report stresses this concept since the severity of bleomycin-induced lung fibrosis was decreased in transgenic mice overexpressing IL-4 compared with knock-out mice lacking IL-4 (17).

On the other hand, increased expression of TIMP-2, an inhibitor of MMP as well as an inductor of cell proliferation, has been found in pulmonary fibrosis (7, 12). Furthermore, TIMP-2 appears to be specifically synthesized by fibroblasts/myofibroblasts in the characteristic fibroblastic foci of IPF lungs (12, 44). Interestingly, an important link between IL-4 and TIMP-2 has been recently reported (15). From a variety of cytokines and growth factors assayed, only IL-4 was demonstrated to induce a dose- and time-dependent induction of TIMP-2 mRNA and protein by dermal fibroblasts.

Another important finding in guinea pigs from the TS/B group is the noteworthy increase in BAL eosinophils, a process that may be at least partially associated with the increase in IL-4 and the Th2-like cytokine network. Eosinophils have been associated with a number of tissue fibrotic conditions (30) and have been shown to act as direct modulatory cells in fibroblast proliferation, collagen synthesis, and lattice contraction, in part, through TGF- β (22). Furthermore, TGF- β 1-producing eosinophils were predominantly localized within areas of active fibrosis in bleomycin-induced lung injury (52). It has been suggested that fibroblasts and alveolar epithelial cells may modulate eosinophil recruitment into the lung in this experimental model (38). The presence of eosinophils in the lungs of pa-

tients with pulmonary fibrosis has been correlated with poor prognosis or resistance to therapy (5).

In summary, our results demonstrate that exposure to cigarette smoke enhances lung fibrosis induced by bleomycin. This effect seems to be at least partially related with an increase in BAL neutrophils, MMP-9, and fibroproliferative activities. Guinea pigs that were exposed to smoke first and then were injured with bleomycin exhibited the highest fibrotic reaction, which was characterized by a Th2-like milieu.

DISCLOSURES

This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica Grant IN-210999.

REFERENCES

- Adesina AM, Vallyathan V, McQuillen EN, Weaver SO, and Craighead JE. Bronchiolar inflammation and fibrosis associated with smoking. *Am Rev Respir Dis* 143: 144–149, 1991.
- Anderson R, Theron AJ, Richards GA, Myer MS, and van Rensburg AJ. Passive smoking by humans sensitizes circulating neutrophils. *Am Rev Respir Dis* 144: 570–574, 1991.
- Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, and Waldron JA. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 242–248, 1997.
- Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks WC, Shipley JM, and Senior RM. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 157: 525–535, 2000.
- Boomars KA, Wagenaar SS, Mulder PGH, Velzen-Blad H, and van den Bosch JMM. Relationship between cells obtained by bronchoalveolar lavage and survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 50: 1087–1092, 1995.
- Braun KM, Cornish T, Valm A, Cundiff J, Pauly JL, and Fan S. Immunotoxicology of cigarette smoke condensates: suppression of macrophage responsiveness to interferon gamma. *Toxicol Appl Pharmacol* 149: 136–143, 1998.
- Brew K, Dinakarpanian D, and Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267–283, 2000.
- Cailes JB, O'Connor C, Pantelidis P, Southcott AM, Fitzgerald MX, Black CM, and du Bois RM. Neutrophil activation in fibrosing alveolitis: a comparison of lone cryptogenic fibrosing alveolitis and systemic sclerosis. *Eur Respir J* 9: 992–999, 1996.
- Cheever AW, Williams ME, Wynn TA, Finkelman FD, Seder RA, Cox TM, Hieny S, Caspar P, and Sher A. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol* 153: 753–759, 1994.
- Depierre A, Dalphin JC, Pernet D, Dubiez A, Faucompre C, and Breton JL. Epidemiological study of farmer's lung in five districts of the French Doubs province. *Thorax* 43:429–435, 1988.
- Douglas JG, Middleton WG, Gaddie J, Petrie GR, Choo-Kang YF, Prescott RJ, and Crompton GK. Sarcoidosis: a disorder commoner in non-smokers? *Thorax* 41: 787–791, 1986.
- Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, and Yamanaoka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 78: 687–698, 1998.
- Gillery P, Fertin C, Nicolas JF, Chastang F, Kalis B, Banchereau J, and Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen gene expression in human fibroblast monolayer cultures. Potential role in fibrosis. *FEBS Lett* 302: 231–234, 1992.
- Hiwatari N, Shimura S, and Takishima T. Pulmonary emphysema followed by pulmonary fibrosis of undetermined cause. *Respiration* 60: 354–358, 1993.
- Ihn H, Yamane K, Asano Y, Kubo M, and Tamaki K. IL-4 up-regulates the expression of tissue inhibitor of metalloprotein-

- ase-2 in dermal fibroblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Immunol* 168: 1895–1902, 2002.
16. **Ishii T, Matsuse T, Igarashi H, Masuda M, Teramoto S, and Ouchi Y.** Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: protective effect of glutathione S-transferase P1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L1189–L1195, 2001.
 17. **Izbicki G, Or R, Christensen TG, Segel MJ, Fine A, Goldstein RH, and Breuer R.** Bleomycin-induced lung fibrosis in IL-4-overexpressing and knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L1110–L1116, 2002.
 18. **Johansson S, Bjermer L, Franzen L, and Henriksson R.** Effects of ongoing smoking on the development of radiation-induced pneumonitis in breast cancer and oesophagus cancer patients. *Radiother Oncol* 49: 41–47, 1998.
 19. **Jones HA, Schofield JB, Krausz T, Boobis AR, and Haslett C.** Pulmonary fibrosis correlates with the duration of tissue neutrophil activation. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 620–628, 1998.
 20. **King TE Jr, Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA Jr, Flint A, Thurlbeck W, and Cherniack RM.** Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1025–1032, 2001.
 21. **King TE Jr, Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, and Cherniack RM.** Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1171–1181, 2001.
 22. **Levi-Schaffer F, Garbuzenko E, Rubin A, Reich R, Pickholz D, Gillery P, Emonard H, Nagler A, and Maquart FA.** Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9660–9665, 1999.
 23. **Makhluf HA, Stepniakowska J, Hoffman S, Smith E, LeRoy EC, and Trojanowska M.** IL-4 upregulates tenascin synthesis in scleroderma and healthy skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 107: 856–859, 1996.
 24. **McCawley LJ and Matrisian LM.** Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Curr Opin Cell Biol* 13: 534–540, 2001.
 25. **Murin S, Smith Bilello K, and Matthay R.** Other smoking-affected pulmonary diseases. *Clin Chest Med* 21: 121–137, 2000.
 26. **Myers JL, Veal CF Jr, Shin MS, and Katzenstein ALA.** Respiratory bronchiolitis causing interstitial lung disease. A clinicopathologic study of six cases. *Am Rev Respir Dis* 135: 880–884, 1987.
 27. **Nakamura Y, Romberger DJ, Tate L, Ertl RF, Kawamoto M, Adachi Y, Mio T, Sisson JH, Spurzem JR, and Rennard SI.** Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1497–1503, 1995.
 28. **Nilsson K, Henriksson R, Cai YQ, Hellstrom S, Hornqvist Bylund S, and Bjermer L.** Effects of tobacco-smoke on radiation-induced pneumonitis in rats. *Int J Radiat Biol* 62: 719–727, 1992.
 29. **Nobukuni S, Watanabe K, Inoue J, Wen FQ, Tamaru N, and Yoshida M.** Cigarette smoke inhibits the growth of lung fibroblasts from patients with pulmonary emphysema. *Respirology* 7: 217–223, 2002.
 30. **Noguchi H, Kephart GM, Colby TV, and Gleich GJ.** Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis. *Am J Pathol* 140: 521–528, 1992.
 31. **Ong F, Wong C, Roberts CR, Teh HS, and Jirik FR.** Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma. *Eur J Immunol* 28: 2619–2629, 1998.
 32. **Osana K, Takahashi K, Suwabe A, Takada K, Ikeda H, Sato S, and Yasui S.** The effect of cigarette smoke on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am Rev Respir Dis* 138: 1276–1281, 1988.
 33. **Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura-Valdez L, Carrillo G, Estrada A, Mejía M, and Selman M.** Increase of lung neutrophils and upregulation of neutrophil gelatinase B and collagenase in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1698–1704, 2000.
 34. **Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Ramirez R, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Barrios R, Kala SV, Lieberman MW, and Selman M.** Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 925–932, 2003.
 35. **Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, and Raghoebar R.** Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix protein in response to interleukin 4. *J Clin Invest* 90: 1479–1485, 1992.
 36. **Postlethwaite AE and Seyer JM.** Fibroblast chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4: identification by synthetic peptide analysis of two chemotactic domains residing in amino acid sequences 70–88 and 89–122. *J Clin Invest* 87: 2147–2152, 1991.
 37. **Ramos C, Montañó M, García-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, and Pardo A.** Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and TIMP's expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 591–598, 2001.
 38. **Sato E, Koyama S, and Robbins RA.** Bleomycin stimulates lung fibroblast and epithelial cell lines to release eosinophil chemotactic activity. *Eur Respir J* 16: 951–958, 2000.
 39. **Schwarz MI.** Approach to the understanding, diagnosis, and management of interstitial lung disease. In: *Interstitial Lung Disease*, edited by Schwarz MI and King TE. Hamilton, Ontario, Canada: Decker, 1998, p. 3–30.
 40. **Segura L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, and Selman M.** Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 117: 684–694, 2000.
 41. **Selman M.** Hypersensitivity pneumonitis. In: *Interstitial Lung Disease*, edited by Schwarz MI and King TE. Hamilton, Ontario, Canada: Decker, 1998, p. 393–422.
 42. **Selman M, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramirez R, Kudlacz EM, Mitchell PG, and Pardo A.** Matrix metalloproteinases inhibition abrogates tobacco smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Chest* 123: 1633–1641, 2003.
 43. **Selman M, Montañó M, Ramos C, Vanda B, Becerril C, Delgado J, Sansores R, Barrios R, and Pardo A.** Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 271: L734–L743, 1996.
 44. **Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios B, and Pardo A.** TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L562–L574, 2000.
 45. **Sempowski GD, Beckmann MP, Derdak S, and Phipps RP.** Murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Immunol* 152: 3606–3614, 1994.
 46. **Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, Okada Y, Yamasawa F, Nakahara K, and Umeda A.** Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1476–1483, 2001.
 47. **Travis WD, Borok Z, Roush JH, Zhang J, Feuerstein I, Ferrans VJ, and Crystal RG.** Pulmonary Langerhans cell granulomatosis (histiocytosis X): a clinicopathologic study of 48 cases. *Am J Surg Pathol* 17: 971–986, 1993.
 48. **Woessner JF.** The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 93: 440–447, 1961.
 49. **Yousem SA, Colby TV, and Gaensler EA.** Respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease and its relationship to desquamative interstitial pneumonia. *Mayo Clin Proc* 64: 1373–1380, 1989.
 50. **Yu Q and Stamenkovic I.** Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14: 163–176, 2000.
 51. **Yu W and Woessner F Jr.** Heparin-enhanced zymographic detection of matrilysin and collagenases. *Anal Biochem* 293: 38–42, 2001.
 52. **Zhang K, Flanders KC, and Phan SH.** Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 147: 352–361, 1995.



laboratory and animal investigations

Matrix Metalloproteinases Inhibition Attenuates Tobacco Smoke-Induced Emphysema in Guinea Pigs*

Moisés Selman, MD, FCCP; José Cisneros-Lira, MSc; Miguel Gaxiola, MD; Remedios Ramírez, MSc; Elizabeth M. Kudlacz, PhD; Peter G. Mitchell, PhD; and Annie Pardo, PhD

Study objective: To evaluate the effect of CP-471,474 (Pfizer Global Research and Development, Groton, CT), a broad-spectrum inhibitor of matrix metalloproteinases (MMPs) in an experimental model of emphysema.

Design: Randomized, double-blinded, controlled experiment.

Setting: Biochemistry and morphology laboratories and animal research facility.

Methods: Guinea pigs were exposed to cigarette smoke over 1 month, 2 months, and 4 months, and half of the animals received CP-471,474. Age-matched guinea pigs exposed to room air were used as control animals. After death, the lungs were lavaged with saline solution, and MMPs in the lavage fluid were determined by zymography and immunoblot. Lungs were fixed for histology, immunohistochemistry, and morphometry.

Results: Following a 1-month exposure to tobacco smoke, semiquantitative histologic assessment showed moderate lung inflammation, which progressed in extent and severity and reached a peak at 2 months. CP-471,474 significantly reduced both the extent ($p < 0.002$) and severity ($p < 0.05$) of inflammation at 2 months. At 4 months, a spontaneous reduction of the inflammatory response was observed in both treated and untreated animals, and consequently no difference was observed between both. Emphysematous changes, revealed by a significant increase in the average size of alveoli, were detected at 2 months and 4 months of tobacco smoke exposure. The inhibitor significantly decreased the destructive lesions mainly at 2 months ($p < 0.0001$) and also at 4 months ($p < 0.02$). Smoking increased MMP-9 and MMP-1 activities as shown by zymography and immunoblot. Immunoreactive MMP-9 was mainly localized in alveolar and bronchiolar epithelial cells, macrophages, and airways smooth-muscle cells.

Conclusion: These findings support a role for MMPs in the early inflammatory response and in the emphysematous lesions provoked by cigarette smoking.

(CHEST 2003; 123:1633-1641)

Key words: collagenases; COPD; gelatinases; pulmonary emphysema

Abbreviation: MMP = matrix metalloproteinase

*From the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Drs. Selman and Gaxiola, and Mr. Cisneros-Lira), Tlalpan, Mexico; Pfizer Global Research and Development (Drs. Kudlacz and Mitchell), Groton, CT; and Facultad de Ciencias (Mr. Ramírez and Dr. Pardo), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, México.

This work was partially supported by PAPIIT # IN 210999. Manuscript received March 18, 2002; revision accepted August 30, 2002.

Reproduction of this article is prohibited without written permission from the American College of Chest Physicians (e-mail: permissions@chestnet.org).

Lung emphysema is a major component of tobacco-smoke induced COPD. The condition is characterized by enlargement of respiratory regions of the lung distal to the terminal bronchioles and is accompanied by the destruction of the alveolar septa, leading to progressive and irreversible respiratory insufficiency.¹ The prevalent theory for the patho-

Correspondence to: Annie Pardo, PhD, Facultad de Ciencias, UNAM, Apartado Postal 21-630, Coyoacan, México DF, 04000, México; e-mail: aps@hp.fciencias.unam.mx

genesis of emphysema is that the disease results from an excessive neutrophil elastase burden in the lower respiratory tract.¹⁻³ In recent years, however, a growing body of evidence strongly suggests that other enzymes, primarily matrix metalloproteinases (MMPs), play a role in the disruption of the alveolar walls.

The first important contribution suggesting a role for interstitial collagenase (MMP-1) in the pathogenesis of this disease was reported by D'Armiento et al,⁴ who demonstrated that mice expressing a collagenase transgene in their lungs had morphologic changes strikingly similar to human emphysema. This finding was later confirmed in an experimental model induced by tobacco smoke in guinea pigs.⁵ In this model, animals exposed to cigarette smoke exhibited progressive lung inflammatory lesions of mononuclear predominance, and after 6 to 8 weeks a varied degree of emphysematous changes. The progression of bronchiolar and alveolar inflammation was coincident with the development of emphysematous lesions, expression of MMP-1, and increased collagenolytic activity. The up-regulation of MMP-1 has been confirmed in human emphysematous lung tissues obtained from individuals during lung reduction surgery or necropsy and collagenase activity has been detected in BAL fluid of patients with pulmonary emphysema.⁶⁻⁸

In addition to MMP-1, other MMPs could contribute to disruption of the alveolar walls. For example, immunohistochemical and zymographic analysis of COPD lungs have revealed marked increases in expression of collagenase-2 (MMP-8), gelatinase A (MMP-2), and gelatinase B (MMP-9).⁷ Alveolar macrophages obtained from BAL of patients with emphysema produce elevated quantities of MMP-1 and MMP-9.⁹ Additionally, macrophage metalloelastase (MMP-12) may be important since emphysematous lesions did not develop in metalloelastase-deficient mice in response to long-term exposure to cigarette smoke.¹⁰

There is currently no therapy for the treatment of lung emphysema. Theoretically, inhibition of the enzymes responsible for the continuous disruption of the pulmonary extracellular matrix could arrest the progression of the disease. Therefore, the aim of this work was to examine the efficacy of the broad-spectrum MMP inhibitor CP-471,474 (Pfizer Global Research and Development; Groton, CT)¹¹ in the progression of tobacco-smoke induced emphysema in guinea pigs.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Model

Three groups of 16 guinea pigs (Hartley; Harlan Sprague Dawley; Madison, WI) weighing 400 to 450 g were exposed to the

whole smoke of 20 commercial cigarettes per day, 5 days per week, for 1 month, 2 months, and 4 months through a whole-body exposure chamber.⁵ Eight animals in each group received CP-471,474. Eight age-matched guinea pigs exposed to room air were used as control animals at 1 month, 2 months, and 4 months. The protocol was approved by the Committee on Use and Care of Animals from the National Institute of Respiratory Diseases.

CP-471,474 Dosing Schedule

Guinea pigs were pretreated 30 min prior to smoke exposure with CP-471,474 (20 mg/kg subcutaneously in 20% ethanol/80% polyethylene glycol with molecular weight of 300) or an equivalent volume of vehicle. This treatment was administered once a day during the entire course of the experiment. The range of CP-471,474 plasma levels following subcutaneous injection were 2,020 ng/mL (1 h postdose) to 160 ng/mL (6 h postdose). In addition, CP-471,474 was also supplemented daily by the diet (200 mg/200 g powdered chow), which maintain plasma levels of 180 to 500 ng/mL during feeding times.

Histology

Groups of eight control, tobacco-smoke exposed, and tobacco-smoke plus CP-471,474-treated animals were anesthetized with sodium pentobarbital 50 mg/kg intraperitoneally at 1 month, 2 months, or 4 months of treatment. Lungs were instilled with 10% formaldehyde for histology, immunohistochemistry, and morphometry.⁵ The lungs were inflated at an initial pressure of 50 cm H₂O followed by a continuous pressure infusion at 25 cm H₂O.

Semiquantitative Histologic Assessment

The extent and severity of the inflammatory lesions was examined in a blind fashion as described previously for human samples.^{12,13} Briefly, the assessment was done on the slide scanned completely in zigzag fashion, at $\times 25$ magnification in approximately 8 to 10 fields. In all cases, two slides from each lung stained with hematoxylin-eosin were analyzed. The percentage of lung inflammation (extent of the lesion) was first determined and twice evaluated by the same pathologist with a 4-month difference. The intraclass correlation coefficient was 0.8 ($p < 0.01$). The severity of the inflammatory lesions was qualitatively evaluated as none, slight, moderate, or severe (0, 1, 2, and 3, respectively). Some slides were stained with Gomori iron staining since lung burden of iron is increased in cigarette smoking, and sequestered within alveolar macrophages.¹⁴

Evaluation of Air Spaces by Digital Image

Ten areas of hematoxylin-eosin-stained sections with maximum alveoli present were sampled. Photographs were taken with a $10\times$ objective on a Nikon Microphot FXA (Nikon; Melville, NY) interfaced to a Sony DKC-5000 digital camera system (Sony; New York, NY). The images were collected directly into an image analysis program (Optimas 6.5; MediaCybernetics; Carlsbad, CA). A threshold unique to each image was set on the air spaces, and the sample areas were set automatically around that threshold. Each image was inspected for accuracy of the samples, and any bronchioles, blood vessels, and edges around the lung were manually removed from the data set. Approximately the same number of air spaces were counted and measured for all conditions (from 19,765 to 39,922). Area, perimeter, and circularity measurements were exported to Microsoft Excel (Microsoft;

Redmond, WA). Analysis was done in both Excel and Stat View 5.0.1 (SAS Institute; Cary, NC).

BAL Gelatin Zymography

In a parallel experiment, six animals per group underwent lavage for zymography adjusting BAL fluid samples to contain 5 µg of protein in 15 µL of loading buffer. Samples from control, tobacco smoke-treated, and tobacco smoke plus CP-471,474-treated animals at 2 months and 4 months were analyzed by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (8.5%) containing gelatin (1 mg/mL) as described elsewhere.¹⁵ For the detection of collagenases, a final concentration of 0.3 mg/mL heparin was included in the loaded samples.¹⁶ Serum-free conditioned media from human lung fibroblasts was used as an MMP-2 marker, conditioned medium from human lung fibroblasts stimulated with fibroblast growth factor-1/heparin was used as an MMP-1 marker,¹⁷ and conditioned from PMA stimulated U2-OS cells was utilized as an MMP-9 marker. Gelatinolytic activities were quantified using image analysis software (ID; Eastman Kodak Company; Rochester, NY), which quantifies the surface and intensity of lysis bands. Results were expressed in relative units.

Western Blot Analysis

BAL samples were concentrated four times, and protein content was determined using BioRad protein assay (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA). Total proteins (20 µg per lane in 15 µL volume) were resolved by 8.5% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under reduced conditions and transferred by semi-dry electrophoretic transfer at 15 V for 20 min to nitrocellulose membrane (Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech; Amersham, UK). Nonspecific binding sites were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline solution Tween buffer (10 mM Tris base, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) at room temperature for 1 h, and then incubated at 4°C overnight with goat polyclonal antibody against human MMP-1 (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA) [1:350] in blocking buffer. After washing with Tris-buffered saline solution Tween buffer, the membrane was incubated with horseradish peroxidase donkey anti-goat IgG 1:5000 for 1 h at room temperature, washed twice, and developed with the Enhanced Chemiluminescence detection system (Amersham Pharmacia Biotech) according to the instructions of the manufacturer. Radiograph film (X-OMAT; Eastman Kodak Company) was exposed to chemiluminescence reaction for 1 min and then developed. The image was digitalized with a DC-120 digital camera (Eastman Kodak Company) and quantified as mentioned for zymography.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical evaluation was performed as described elsewhere.¹⁸ Tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and then blocked with 3% H₂O₂ in methanol for 30 min followed by antigen retrieval performed with citrate buffer (10 mM, pH 6.0) for 5 min in a microwave. Tissue sections were treated with an antibody diluent with background reducing components (Dako; Carpinteria, CA) diluted 1/100 in phosphate-buffered saline solution for 45 min, and then incubated with anti-MMP-9 (Chemicon International; Temecula, CA), at 4°C overnight. A secondary biotinylated anti-Ig followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BioGenex; San Ramon, CA) was used according to instructions of the manufacturer. 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC; BioGenex) in acetate buffer containing

0.05% H₂O₂ was used as substrate. The sections were counterstained with hematoxylin. The primary antibody was replaced by nonimmune serum for negative control slides.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SD. Comparisons were made using an unpaired Student *t* test. The Tukey test was used for multiple comparisons. For digital image analysis of air spaces, the Dunnett test was used. Values of *p* < 0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

CP-471,474 was synthesized at Pfizer Global Research and Development (Fig 1). Characteristics and the selectivity of this compound have been reported previously.¹¹ A summary of its activity against different MMPs is shown in Table 1.

Morphologic Study

Lungs derived from guinea pigs exposed for 1 month to tobacco smoke showed a moderate peribronchiolar, alveolar, and interstitial inflammation (Fig 2, *top left*, A) that progressed both in extent and severity as compared to control animals (Fig 2, *bottom right*, F). These effects reached a peak after 2 months of exposure, at which time emphysematous lesions were also evident (Fig 2, *top center*, B). Interstitial inflammation consisted mainly of lymphocytes and macrophages, although polymorphonuclear cells were also observed. Macrophages were

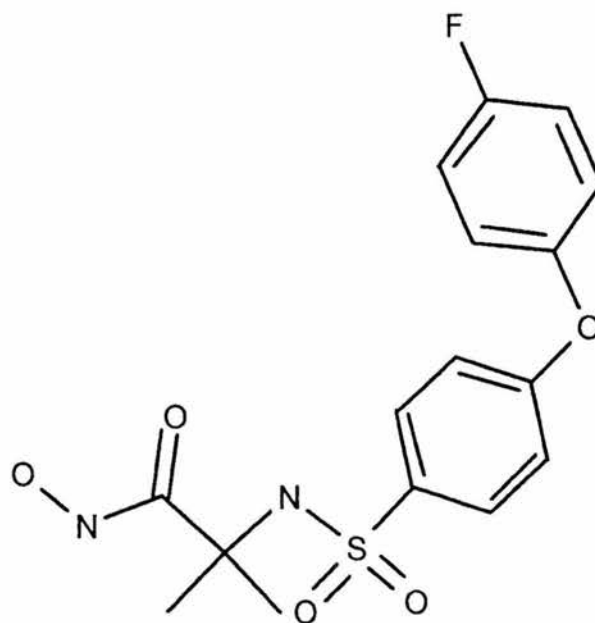


FIGURE 1. Structure of CP-471,474 (2-[4-(4-fluoro-phenoxy)-benzenesulfonylamino]-N-hydroxy-isobutyramide).

Table 1—Inhibitory Activity of CP-471474 on Various MMPs*

MMP	IC ₅₀ , ng/mL
1	190
2	0.4
3	5.9
8	3.3
9	4.0
12	0.5
13	0.1

*Fifty percent inhibitory concentration (IC₅₀) values were calculated using recombinant human enzymes and fluorescent peptide substrates, as outlined previously.¹¹ Each value is the average of a minimum of three independent replicates.

the primary intra-alveolar inflammatory cells and often contained pigmented cytoplasm with finely granular iron-stained particles as shown following 2 months of exposure (Fig 2, *top right, C*). After 4 months of tobacco smoke exposure, inflammatory lesions were diminished although emphysematous lesions persisted (not shown). A decrease in the inflammatory response was observed in the lungs of tobacco smoke-exposed animals treated with the MMP inhibitor CP-471,474, following both 1 month and 2 months of cigarette smoke inhalation (Fig 2, *bottom left, D*, and *bottom center, E*). Semiquantita-

tive analysis of the histopathologic lesions (Table 2) revealed a marginal but significant decrease in the severity of inflammation in tobacco smoke-exposed guinea pigs receiving drug administration for 1 month ($p = 0.05$). A significant reduction in both extent ($p < 0.002$) and severity ($p < 0.05$) of inflammation was observed at 2 months of tobacco smoke exposure plus CP-471,474, corresponding to approximately 80% and 40% of protection. At 4 months, tobacco smoke-exposed animals not receiving CP-471,474 showed a reduction of lung inflammation, and no differences with the treated group were noted.

Emphysematous Changes

Lung parenchymal destruction was evaluated using digital imaging and was expressed as mean area of alveolar air spaces (Fig 3). At 1 month of smoke exposure, there were no differences between the lungs from control guinea pigs and tobacco smoke-injured animals receiving vehicle or CP-471,474. At 2 months and 4 months, however, tobacco smoke-exposed guinea pigs exhibited a significant increase in the average size of alveoli, indicating that the lungs were emphysematous. Lungs derived from smoking animals treated with CP-471,474 demonstrated a statistically significant reduction in the destructive lesions. This effect was most

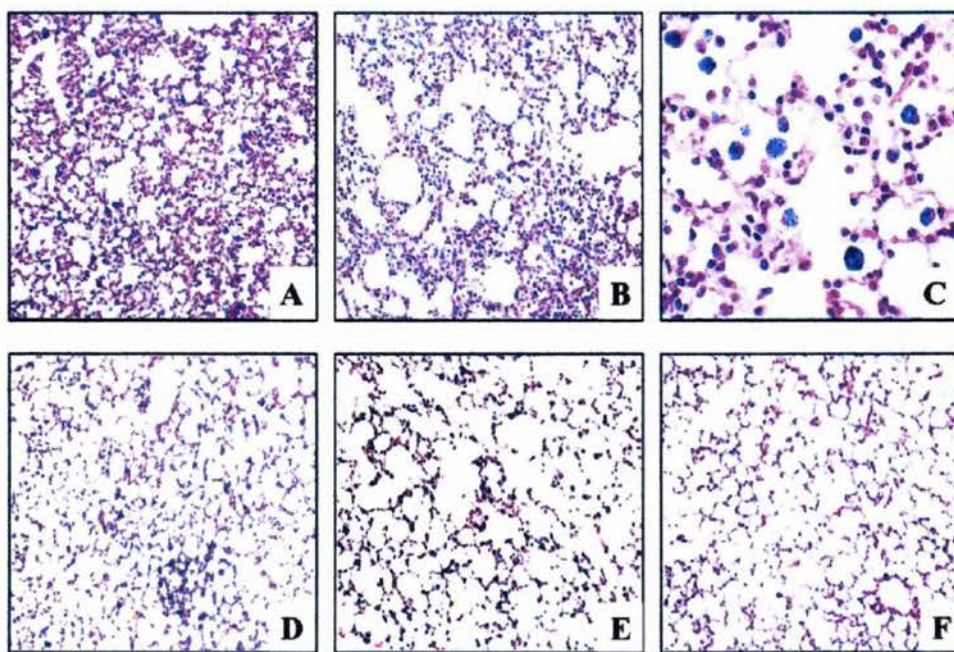


FIGURE 2. Representative photomicrographs of hematoxylin-eosin-stained sections of experimental and control guinea pig lung tissues. *Top left, A:* lung after 1 month of tobacco smoke exposure ($\times 10$). *Top center, B:* tobacco smoke-exposed lung after 2 months of exposure ($\times 10$). *Top right, C:* several iron-positive macrophages with a Gomori reaction staining in an 2-month tobacco smoke-exposed guinea pig lung ($\times 40$). *Bottom left, D:* tobacco smoke plus CP-471,474 at 1 month ($\times 10$). *Bottom center, E:* tobacco smoke plus CP-471,474 at 2 months ($\times 10$). *Bottom right, F:* control lung ($\times 10$).

Table 2—Semiquantitative Histologic Assessment of Inflammation*

Months of Exposure, No.	Control	Smoking Plus Vehicle	Smoking Plus CP-471,474
Extent of lesion, %			
1	3.8 ± 2.1	19.3 ± 15.9	13.6 ± 6.3
2	2.3 ± 2.3	34.3 ± 18.6†	6.9 ± 7.2
4	2.4 ± 1.8	10.8 ± 6.5	9.6 ± 7.5
Severity of inflammation			
1	0.8 ± 0.3	1.6 ± 0.8	1.0 ± 0.0
2	0.7 ± 0.5	2.4 ± 0.5‡	1.4 ± 0.9
4	0.7 ± 0.6	1.5 ± 0.9	1.7 ± 0.5

*Data are mean ± SD from eight animals per group per time point.

†Significant difference from cigarette smoke exposure plus CP-471,474 ($p < 0.002$).

‡Significant difference from cigarette smoke exposure plus CP-471,474 ($p < 0.05$).

evident at 2 months ($p < 0.0001$), at which time the lung alveoli size in the CP-471,474-treated animals was equivalent to those of control animals, thus showing a 100% protection. At 4 months, the reduction of the size of alveoli in the tobacco smoke-exposed animals treated with CP-471,474 was less marked, reaching only approximately 30% of protection, which was still statistically different from the tobacco smoke-exposed animals not receiving CP-471,474 ($p < 0.02$). The size of alveolar spaces in lungs from control guinea pigs was consistent throughout the study.

Zymography of BAL

BAL fluid from six animals of the different groups was analyzed by gelatin zymography with heparin. A representative zymogram obtained from three pooled samples of different animals is illustrated in Figure 4, top, A. BAL fluid samples from tobacco smoke-exposed animals (2 months and 4 months) with and without CP-471,474 showed an increase of both pro-MMP-9 and its active form (lanes 5 to 8) as compared with control animals (lane 4). Densitometric analysis of total MMP-9 (proenzyme plus active form) revealed a 8.4-fold (2 months) and 12.6-fold (4 months) increase in tobacco smoke-exposed animals over control animals. Inhibitor treatment reduced this effect by 50% (Fig 4, center, B). Pro-MMP-2 and MMP-2 activities were slightly increased from 1.4-fold to 2.6-fold in experimental animals as compared to control animals. No differences were observed between CP-471,474-treated or untreated tobacco-smoke exposed animals.

Because MMP-1 is difficult to detect at low levels in conventional gelatin zymography, heparin was used to enhance the signal.¹⁶ MMP-1 produced by human lung fibroblasts stimulated with fibroblast growth factor-1 plus heparin was used as a positive control.¹⁷ MMP-1 in active and latent forms is expected to be in the range of 40 to 60 kd. Bands corresponding to these molecular weights were clearly seen in samples from guinea pigs exposed to

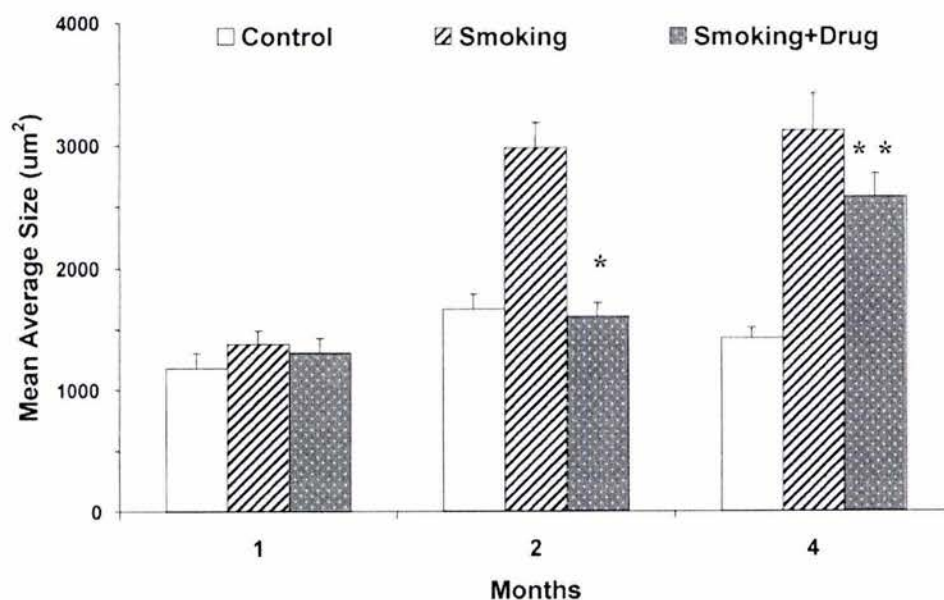


FIGURE 3. Evaluation of airspace changes by digital image analysis in hematoxylin-eosin-stained sections. A significant decrease in the mean size of the emphysematous lesions was observed at 2 months and 4 months in tobacco smoke-exposed guinea pigs receiving CP-471,474 ($*p < 0.0001$ and $**p < 0.02$, respectively, compared with the untreated tobacco smoke-exposed animals).

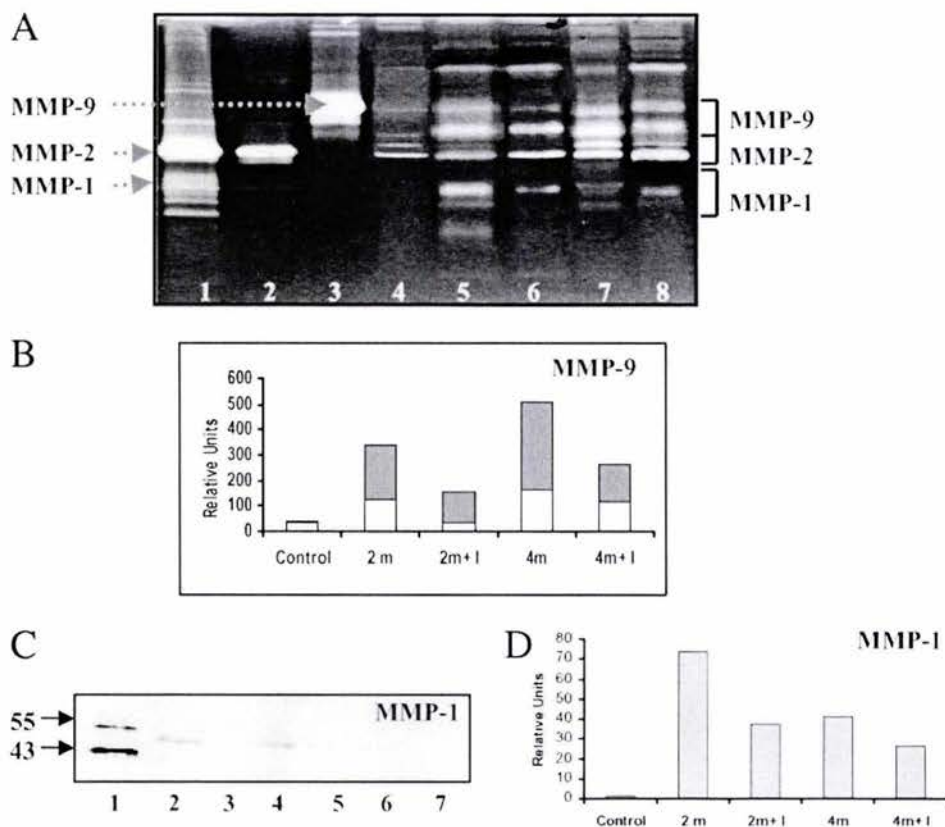


FIGURE 4. Identification of gelatinases and MMP-1 by gelatin zymography enhanced with heparin and Western blot analysis. *Top, A:* zymography of BAL fluids. Lane 1 shows conditioned media from lung fibroblasts stimulated with fibroblast growth factor-1. Arrows indicate MMP-1 and MMP-2. Lane 2 shows conditioned media from lung fibroblasts showing MMP-2. Lane 3 shows conditioned media from PMA-stimulated U2-OS cells showing MMP-9. Also shown are control animals (lane 4), 2-month and 4-month untreated tobacco smoke-exposed animals (lanes 5 and 7), and 2-month and 4-month tobacco smoke-exposed animals receiving CP-471,474 (lanes 6 and 8). *Center, B:* densitometric analysis of pro-MMP-9 and activated form showed in the zymogram. □ represents proenzyme, and shading indicates activated MMP-9. *Bottom left, C:* Western blot analysis of BAL fluids with MMP-1 antibody. Also shown are positive control for MMP-1 (AG770; Chemicon International; [lane 1]) and conditioned media derived from fibroblast growth factor-1/heparin stimulated lung fibroblasts (lane 2); control guinea pigs (lane 3); 2-month and 4-month untreated tobacco smoke-exposed animals (lanes 4 and 6); and 2-month and 4-month tobacco smoke-exposed animals receiving CP-471,474 (lanes 5 and 7). *Bottom right, D:* densitometric analysis of Western MMP-1.

cigarette smoke for both 2 months and 4 months (Fig 4, *top, A*, lanes 5 and 7). CP-471474 treatment reduced the MMP-1 activity at 2 months and 4 months (lanes 6 and 8).

Western Blot Analysis

To further support the observations related with MMP-1 in zymograms, BAL fluid samples from control, and 2-month and 4-month tobacco smoke-exposed guinea pigs with and without the drug were analyzed by Western blotting. In accordance with the zymogram findings, a more intense immunoreactive MMP-1 band was observed in the sample from guinea pigs exposed to cigarette smoke for 2 months compared with 4 months (Fig 4, *bottom left*,

C, lanes 4 and 6). CP-471474 treatment reduced 50% MMP-1 protein at 2 months and 4 months (Fig 4, *bottom left, C*, lanes 5 and 7). BAL findings from control animals were negative for MMP-1 (lane 2). Densitometric analysis is illustrated in Figure 4, *bottom right, D*.

Lung Localization of MMP-9 by Immunohistochemistry

Since an increase in MMP-9 gelatinolytic activity was observed in BAL fluid from tobacco smoke-exposed animals, the cellular source was investigated by immunohistochemistry. Tobacco smoke-exposed guinea pigs killed at 2 months and 4 months with and without CP-471,474 treatment were examined for

the cellular source of lung MMP-9. A strong signal for MMP-9 was observed in cells located in the corners of alveoli, protruding into the alveolar spaces. These cells were putatively identified as type II pneumocytes (Fig 5, top left, A). A positive cytoplasmic label was also observed in macrophages, and in bronchiolar epithelium and smooth-muscle cells (Fig 5, top right, B). No differences in cell localization were observed among CP-471,474-treated and untreated animals. MMP-9 was barely detectable in lung sections from control animals (Fig 5, bottom left, C). Controls using nonspecific antisera showed no reactivity (Fig 5, bottom right, D).

DISCUSSION

Among the problems faced in the treatment of pulmonary emphysema are its complex pathogenesis and the irreversible destruction of the alveolar walls. The disease was initially attributed to excessive lung elastolytic activity resulting from either an increase of neutrophil elastase and/or genetic or functional deficiency of α_1 -proteinase inhibitor.^{2,19}

More recently, however, a number of studies, both in the human disease and experimental models, have supported a pivotal role for MMPs.⁴⁻⁹ Immunoreactivity for MMP-2 and MMP-9 has been shown to be up-regulated in lung tissues from patients with

COPD and emphysema.^{7,20} Elastin-degrading activities corresponding to both MMP-2 and MMP-9 but not MMP-12 were elevated in tissue extracts from patients with emphysema compared to smoking control subjects. In an experimental murine model of pulmonary emphysema, it was shown that MMP-9 was up-regulated on overexpression of IL-13 and that genetic ablation of the MMP abrogated this effect.^{21,22} Evidence supporting a role for macrophage metalloelastase was found in mice genetically deficient in MMP-12.¹⁰

In this context, our rationale was that if MMPs were actively participating in the destruction of the alveolar septa, then the use of an MMP inhibitor could represent a potential therapeutic strategy for lung emphysema. Our results demonstrated that the daily administration of the broad-spectrum MMP inhibitor, CP-471474, attenuated both the initial inflammatory response and the emphysematous lesions induced by chronic exposure to cigarette smoke in guinea pigs. However, it is important to emphasize that a spontaneous reduction of the inflammatory response was observed at 4 months in tobacco smoke-exposed animals not receiving CP-471,474, and no differences with the treated guinea pigs were found at this time. Likewise, the attenuation of the emphysematous lesions was evident after 2 months of treatment, coinciding with the peak of the inflammatory response; however, the protective effect of the anti-MMPs drug marginally persisted at 4 months. The reason for these findings is unclear, but it can be speculated that most of the emphysematous lesions at 2 months were related to MMPs secreted by inflammatory cells. The persistence of alveolar septal destruction at 4 months and the lower effect of the drug at this stage may suggest that other enzymes not inhibited by the drug are playing a role.

The ability of CP-471,474 to inhibit lung parenchymal inflammation may be partially explained by the fact that some MMPs, primarily gelatinases, appear to be involved in leukocyte transendothelial migration and subsequent trafficking of leukocytes into the injured tissues. There is a growing body of evidence suggesting that these enzymes participate in lymphocyte and macrophage migration.²³⁻²⁷ Thus, for example, MMP-2 is induced in T lymphocytes by binding to adhesion molecules on endothelial cells, which in turn facilitates T-cell migration into perivascular tissue.²³ Likewise, IL-2 both induces gelatinase B expression by T cells and enhances their migration across basement membrane *in vitro*.²⁴ MMP-2 and MMP-9 have been shown to actively participate in the airway infiltration of lymphocytes and eosinophils in a murine model of allergic asthma.²⁵ In addition, monocytes infected by live, virulent *Mycobacterium tuberculosis* secrete higher amounts of

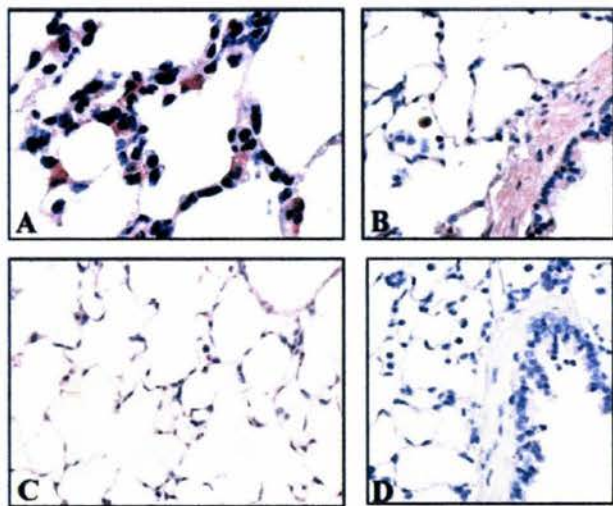


FIGURE 5. Immunohistochemical localization of MMP-9 in lung tissue sections. Immunoreactive gelatinase B was revealed by peroxidase reaction. Sections were lightly counterstained with hematoxylin. Top left, A: 2-month tobacco smoke-exposed guinea pig showing positive labeled alveolar epithelial cells (original $\times 100$). Top right, B: 4-month tobacco smoke-exposed guinea pig exhibiting signal in free alveolar macrophages, epithelial bronchiolar cells, and smooth-muscle cells around the bronchiole (original $\times 40$). Bottom left, C: normal lung (original $\times 40$). Bottom right, D: the primary antibody was replaced by nonimmune serum for negative control slides (original $\times 40$).

MMP-9, which seems to facilitate leukocyte migration across the blood-brain barrier. In fact, MMP-9 concentrations per cerebrospinal fluid leukocyte have been found elevated in fatal tuberculous meningitis and in patients with signs of cerebral tissue damage²⁶; however, there is some controversy regarding the role of MMP-9 in neutrophil migration.²⁸⁻³⁰ In addition, since collagen fragments have been shown to both to be chemotactic and activate alveolar macrophages,³¹ it is possible that the compound could also provide direct protection against inflammation by inhibiting the collagenase activity due to MMP-8, MMP-13, and MMP-14.

CP-471474 also reduced the emphysematous changes, mainly those observed at 2 months, suggesting a protective effect on extracellular matrix degradation. The two major extracellular matrix components of the lung interstitial compartment are fibrillar collagens and elastin that are natural substrates for a number of MMPs. In the present study, BAL fluid revealed an upregulation of MMP-9 in tobacco smoke-exposed guinea pigs, an enzyme that may contribute to elastin degradation. MMP-9 was localized in alveolar and bronchiolar epithelial cells as well as in macrophages. The ability of CP-471474 to reduce MMP-9 activity in BAL fluid is consistent with its *in vitro* activity against this enzyme. Additionally, the finding of less MMP-9 activity on the zymograms of the inhibitor treated guinea pigs might be attributed both to fewer inflammatory cells primarily at 2 months, and/or either to the covalently linkage of the inhibitor to the enzyme. In addition, CP-471474 might provide protection against elastin degradation by blocking the MMP component of elastase activity due to MMP-2 and MMP-12. Likewise, since several MMPs are able to degrade α_1 -proteinase inhibitor, the neutrophil elastase inhibitor,³² MMP inhibition might protect against elastin degradation by this enzyme.

CP-471474 is also a potent inhibitor of MMPs able to degrade fibrillar collagens, including MMP-8, MMP-13, and MMP-14, although it is a weak inhibitor of MMP-1 and would not be expected to inhibit this enzyme under the dosing regimen used in this study. In the present study, in addition to MMP-2 and MMP-9, we detected a gelatinolytic band in heparin-enhanced gelatin zymograms of BAL samples putatively corresponding to MMP-1, which appeared to decrease in drug-treated guinea pigs at 2 months, a result that was confirmed by immunoblotting. Thus, although the drug does not directly inhibit MMP-1 under the conditions of this study, it might be indirectly decreasing this enzyme through a reduction of infiltrating macrophages that are the main source of MMP-1 in this model.⁵

In conclusion, the pathogenesis of emphysema

likely involves a complex network of excessive MMPs and serine proteases activities in the lung leading to alveolar wall disruption. In this context, new directions for effective therapy may arise from a better understanding of these mechanisms. Our study shows that the use of a synthetic MMP inhibitor reduced the inflammatory response and the emphysematous-derived lesions mainly at 2 months in a cigarette smoke-induced model of lung disease, and suggests that probably other enzymes produced by noninflammatory cells not inhibited by the drug are also playing a role.

REFERENCES

- 1 Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, et al. The definition of emphysema: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases Workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:182-185
- 2 Janoff A. Elastases and emphysema: current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:417-433
- 3 Niewoehner DE. Cigarette smoking, lung inflammation, and the development of emphysema. *J Lab Clin Med* 1988; 111:15-27
- 4 D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, et al. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* 1992; 71:955-961
- 5 Selman M, Montañó M, Ramos C, et al. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am J Physiol* 1996; 271: L734-L743
- 6 Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, et al. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax* 1997; 52:502-506
- 7 Segura L, Pardo A, Gaxiola M, et al. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117:684-694
- 8 Imai K, Dalal SS, Chen ES, et al. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:786-791
- 9 Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:240-247
- 10 Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, et al. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997; 277:2002-2004
- 11 Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 1999; 99:3063-3070
- 12 Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, et al. Increase of lung neutrophils and upregulation of neutrophil gelatinase B and collagenase in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1698-1704
- 13 Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, et al. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeders lung compared to those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:49-53
- 14 Wesselius LJ, Nelson ME, Skikne BS. Increased release of ferritin and iron by iron-loaded alveolar macrophages in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 690-695

- 15 Pérez-Ramos J, de Lourdes-Segura-Valdéz M, Vanda B, et al. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1274–1282
- 16 Yu W, Woessner F Jr. Heparin-enhanced zymographic detection of matrilysin and collagenases. *Anal Biochem* 2001; 293:38–42
- 17 Becerril C, Pardo A, Montaña M, et al. Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:1020–1027
- 18 Pardo A, Barrios R, Maldonado V, et al. Gelatinases A and B are upregulated in lung rats by subacute hyperoxia: pathogenic implications. *Am J Pathol* 1998; 153:833–844
- 19 Evans MD, Pryor WA. Cigarette smoking, emphysema, and damage to α_1 -proteinase inhibitor. *Am J Physiol* 1994; 266: L593–L611
- 20 Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, et al. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 1998; 78:1077–1087
- 21 Zheng T, Zhu Z, Wang Z, et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106: 1081–1093
- 22 Lanone S, Zheng T, Zhu Z, et al. Matrix metalloproteinase (MMP-9) deficiency selectively abrogates IL-13-induced phenotypes in the lung [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:A288
- 23 Madri JA, Graesser D, Haas T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol* 1996; 74:749–757
- 24 Leppert D, Waubant E, Burk MR, et al. Interferon β -1b inhibits gelatinase secretion and *in vitro* migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 40:846–852
- 25 Kumagai K, Ohno I, Okada S, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol* 1999; 162:4212–4219
- 26 Price NM, Farrar J, Tran TT, et al. Identification of a matrix-degrading phenotype in human tuberculosis *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2001; 166:4223–4230
- 27 Wong B, Lumma WC, Smith AM, et al. Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation. *J Leukoc Biol* 2001; 69:959–962
- 28 Betsuyaku T, Shipley JM, Liu Z, et al. Neutrophil emigration in the lungs, peritoneum, and skin does not require gelatinase B. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:1303–1309
- 29 D'Haese A, Wuyts A, Dillen C, et al. *In vivo* neutrophil recruitment by granulocyte chemotactic protein-2 is assisted by gelatinase B/MMP-9 in the mouse. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20:667–674
- 30 Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, et al. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14:288–295
- 31 Laskin DL, Soltys RA, Berg RA, et al. Activation of alveolar macrophages by native and synthetic collagen-like polypeptides. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10:58–64
- 32 McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13:534–540