

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**ANALISIS DE LA EXPRESION Y LOCALIZACION DE
COLAGENASA INTERSTICIAL; GELATINASAS A Y B; E
INHIBIDORES TISULARES DE METALOPROTEINASAS 1 y
2; DURANTE EL DESARROLLO DE FIBROSIS PULMONAR
EXPERIMENTAL INDUCIDA CON PARAQUAT E
HIPEROXIA .**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL. VICTOR MANUEL RUIZ LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MOISES EDUARDO SELMAN LAMA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/113Jur/2003

ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM.
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 22 de octubre del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas del Biólogo VICTOR MANUEL RUIZ LOPEZ, con número de expediente 12972723 y número de cuenta 84331878 con la tesis titulada: **"ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE COLAGENASA INTERSTICIAL; GELATINASA A y B; E INHIBIDORES FISULARES DE METALOPROTEINASAS 1 y 2; DURANTE EL DESARROLLO DE FIBROSIS PULMONAR EXPERIMENTAL INDUCIDA CON PARAQUAT E HIPEROXIA"**, dirigida por el Mtro. Moisés Eduardo Selman Lama.

PRESIDENTE: DR. RUY PEREZ TAMAYO
SECRETARIO: MTRO. MOISES SELMAN LAMA
VOCAL: DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
VOCAL: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMIREZ
VOCAL: DR. FERNANDO LOPEZ CASILLAS
SUPLENTE: DRA. ANNIE PARDO SEMO
SUPLENTE: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 28 de octubre del 2003

Dr. Gabriel Roldán Roldán
Responsable
Facultad de Medicina

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas

C.c.p. Biól. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Tutor(a) Mtro. Moisés Selman Lama.

**AGRADEZCO A LAS SIGUIENTES
INSTITUCIONES POR EL APOYO BRINDADO
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE
DOCTORADO:**

A LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

AL CONACYT

**AL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS**

DEDICO ESTE TRABAJO:

A MIS HIJOS:

EFREN

QUIEN SIEMPRE VIVE EN MIS
PENSAMIENTOS

AARÓN

POR SER LA ALEGRÍA DE MI VIDA

A ROSA

POR SU AMOR, SU COMPRENSIÓN Y POR
TODA LA AYUDA QUE ME HA DADO.

A MI MADRE Y

A MI TÍA GLORIA

POR EL AMOR QUE ME HAN BRINDADO
SIEMPRE

AGRADECIMIENTOS:

A MIS TUTORES: ANNIE Y MOISÉS, POR CREER EN MI Y PERMITIRME PERTENECER A SU GRUPO DE INVESTIGACIÓN

A LOS DEMAS MIEMBROS DEL JURADO: DR. JAIME BERUMEN, DR. RUY PEREZ , DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ, DR. FERNANDO LÓPEZ, DR. LUIS MANUEL MONTAÑO, POR SUS OBSERVACIONES Y COMENTARIOS.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL INER, POR SU AYUDA Y COMPRENSIÓN: NACHO, CARMEN, PEPE, ERIKA, RAFAEL, ILIANA, CAROLINA, MARTHA, MARTITA, CARINA, CARLOS, CHIO, ALEJANDRA, LUPITA, MIGUEL, ERIKA M., MAGDA, ALMA, GRISELDA, LAURA, MARICELA, ROCIO C., LULU; Y EN ESPECIAL A MARCO CHECA.

A MIS AMIGOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, POR SU AMISTAD: REMEDIOS, JORGE, SANDRA, LULU.

A MI FAMILIA POR LOS BUENOS MOMENTOS QUE HEMOS PASADO JUNTOS: MALU, MANOLO, KAREN, ESTEFANIA, STEPHANIE, ABRAHAM, LALO, FER, GINA, MARIO, LUIS, ANGELES, LUCIA.

A MIS AMIGOS DE SIEMPRE: TOÑO, JORGE, FELIPE, GERMAN, MAYTE, FEDE.....

A TODOS AQUELLOS QUE TUVIERON QUE VER CON LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO

GRACIAS

INDICE

	Pag.
INDICE	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	5
Fibrosis Pulmonar.....	5
Células epiteliales y fibrogénesis.....	5
Fibroblastos miofibroblastos y fibrosis pulmonar.....	7
Remodelación de la matriz extracelular.....	9
Matriz extracelular.....	10
Metaloproteinasas de la matriz extracelular.....	12
Inhibidores tisulares de la matriz extracelular.....	13
Factores de crecimiento.....	15
Angiotensinógeno.....	16
Paraquat e hiperoxia.....	17
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y METODOS	21
Modelo experimental.....	21
Morfología.....	22
Detección de la fragmentación de DNA <i>in situ</i> (Apoptosis).....	23
Cuantificación de hidroxiprolina.....	23
Inmunohistoquímica para TIMP-1.....	24
Zimografía de tejidos pulmonares.....	25
Cuantificación de TGF β 1 por ELISA.....	27
Northern blot.....	28
RT y PCR en tiempo real.....	30
Análisis estadístico.....	32
RESULTADOS	34
Características generales.....	34
Cambios morfológicos.....	34
Expresión génica y contenido de colágena.....	36
Fragmentación de DNA <i>in situ</i> (Apoptosis).....	38
Cuantificación del RNA ribosomal r18s por PCR en tiempo real.....	38
Cuantificación de la expresión génica para metaloproteinasas de matriz, por PCR en tiempo real.....	41
Detección de la actividad gelatinolítica en tejidos pulmonares.....	41
Cuantificación de la expresión génica para inhibidores tisulares de metaloproteinasas, por PCR en tiempo real.....	45
Localización de TIMP-1 por Inmunohistoquímica.....	48
Cuantificación de la expresión génica para los factores de crecimiento por PCR en tiempo real.....	48
Cuantificación de la expresión génica para angiotensinógeno, por PCR en tiempo real.....	48
Niveles proteicos de TGF β -1 medidos por ELISA.....	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS: ARTICULOS PUBLICADOS	

RESUMEN

Título: Análisis de la expresión y localización de colagenasa intersticial, gelatinasas A y B, e inhibidores tisulares de metaloproteinasas 1 y 2 durante el desarrollo de fibrosis pulmonar experimental inducida con paraquat e hiperoxia.

Antecedentes: La fibrosis pulmonar es el resultado final de una gran diversidad de daños agudos y crónicos al pulmón, y esta caracterizada por una reacción inflamatoria difusa o por la activación y/o daño al epitelio alveolar, seguido por proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y acumulación de proteínas de la matriz extracelular principalmente de colágenas fibrilares. Aunque los mecanismos responsables de la fibrogénesis no se conocen con precisión, estudios recientes involucran un desequilibrio en la expresión de algunas metaloproteinasas de matriz (MMP) y sus inhibidores tisulares (TIMP).

Objetivos: El propósito de este estudio fue analizar la expresión secuencial de metaloproteinasas de matriz, inhibidores tisulares de metaloproteinasas, factores de crecimiento, y presencia de apoptosis durante el desarrollo de un modelo de fibrosis pulmonar experimental.

Material y Métodos: Se utilizó un modelo experimental de fibrosis pulmonar inducido en ratas con paraquat e hiperoxia, para evaluar el proceso de apoptosis y la expresión secuencial de las metaloproteinasas de matriz MMP-2, 8, 9 y 13; de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) TIMP-1, 2 y 3; así como de los factores de crecimiento transformante beta (TGF β -1), derivado de plaquetas (PDGF), del tejido conjuntivo (CTGF) y del péptido angiotensinógeno. Los animales fueron sacrificados a las 1, 2, 3 y 6 semanas; algunos animales que

recibieron la doble agresión y no sufrieron cambios clínicos ni alteraciones morfológicas a las 6 semanas se les denominó resistentes y fueron incluidos como grupo de estudio. Los pulmones fueron utilizados para evaluación morfológica, cuantificación del contenido de colágena, análisis de la expresión génica con PCR en tiempo real, actividad gelatinolítica por zimografía, apoptosis por fragmentación de DNA, localización de proteínas por inmunohistoquímica y cuantificación de proteínas por ELISA.

Resultados: Los animales susceptibles desarrollaron una reacción inflamatoria intensa que fue seguida por fibrosis intersticial difusa. Durante este proceso, las ratas mostraron un decremento significativo en la expresión génica de MMP-8 y MMP-13 con un incremento de TIMP-1 y TGF β -1 que se observó desde la primera/segunda semana de evolución. Por inmunohistoquímica, se corroboró el aumento de TIMP-1 inmunoreactivo (proteína) en las ratas experimentales el cual se localizó principalmente en macrófagos alveolares, y ocasionalmente en células del epitelio alveolar. En cuanto a los niveles de TGF β -1 pulmonar cuantificados por ELISA se observó un incremento de esta proteína en la segunda y tercera semanas, con retorno a niveles normales en la sexta semana; la concentración de la forma activa del TGF β -1 aumentó en la segunda semana. La expresión génica de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 no fue afectada, pero los pulmones mostraron un incremento en la actividad de pro-MMP-2 y en las formas activas de MMP-2 y 9. Finalmente, la apoptosis del epitelio alveolar y bronquiolar fue evidente desde la primera hasta la sexta semana, y se observó también en algunas células

intersticiales en tiempos tardíos (3-6 semanas). En términos generales, los animales resistentes se comportaron como los controles.

Conclusiones: Estos hallazgos sugieren que un incremento en la expresión de TGF β -1, un desequilibrio en la expresión de las colagenasas MMP-8 y MMP-13 y su inhibidor tisular TIMP-1, una excesiva actividad gelatinolítica y apoptosis del epitelio alveolar, participan en el desarrollo de la fibrosis intersticial difusa que caracteriza a nuestro modelo experimental.

INTRODUCCIÓN

Fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar intersticial difusa es el resultado final de un conjunto heterogéneo de enfermedades que afectan al parénquima pulmonar y que se agrupan bajo el término de neumopatías intersticiales difusas (22,82). En la mayoría de estas enfermedades la lesión inicial provoca una extensa reacción inflamatoria la cual, si no se resuelve, es seguida por proliferación de fibroblastos y miofibroblastos y finalmente por acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular principalmente colágenas I y III, con destrucción del parénquima pulmonar (82). La forma idiopática (FPI) representa el prototipo más agresivo de las enfermedades fibrosantes del pulmón y en ésta se ha propuesto que la inflamación no desempeña un papel patogénico, y que la fibrosis ocurre como resultado de la lesión/activación del epitelio alveolar lo cual es seguido por la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y fibrosis (84; figura 1).

Células epiteliales y fibrogénesis

Independientemente de los mecanismos iniciales, numerosos estudios en diferentes modelos experimentales sugieren que la pérdida de integridad del epitelio alveolar es un determinante crítico en el camino hacia el inicio de la fibrogénesis pulmonar. Esto se ha demostrado en explantes pulmonares derivados de ratones expuestos a hiperoxia (1), así como en ratas expuestas a paraquat (61, 64). En estudios que utilizan una doble agresión pulmonar, por ejemplo hiperoxia para potenciar el daño pulmonar inducido por la exposición

previa a hidroxitolueno butilado se ha encontrado que la inhibición de la proliferación y diferenciación de las células del epitelio alveolar favorece una



Figura 1: Principales pasos involucrados en el desarrollo de fibrosis pulmonar difusa.

acelerada fibrogénesis (37). La premisa de que existe una relación similar en el pulmón humano esta basada en el hallazgo de que los focos fibróticos, en especial en la fibrosis pulmonar idiopática, se encuentran frecuentemente en proximidad al epitelio alveolar anormal o en regiones carentes de epitelio (96).

Los mecanismos de lesión epitelial no se conocen con precisión, pero en nuestro laboratorio hemos demostrado que fibroblastos extraídos de pulmones humanos fibróticos producen factores capaces de matar a células epiteliales por apoptosis y necrosis (94). De acuerdo con estos hallazgos *in vitro*, posteriormente

encontramos *in vivo*, usando colocalización y microscopia electrónica, que áreas de extensa apoptosis alveolar y bronquiolar se encontraban en estrecha relación con focos de fibroblastos/miofibroblastos y de depósito de colágenas fibrilares (96). Por otro lado, se conoce que las células del epitelio alveolar expresan funcionalmente Fas (26, 34), y se ha demostrado que la activación de Fas *in vivo* induce apoptosis de células epiteliales y fibrosis pulmonar en ratones (34). Todos estos antecedentes sugieren que la apoptosis de células del epitelio alveolar es un factor importante en el desarrollo de la fibrogénesis en el pulmón.

Fibroblastos, miofibroblastos y fibrosis pulmonar

El depósito anormal de matriz extracelular es precedido por migración y proliferación de fibroblastos en los sitios de lesión, con un cambio de fenotipo a miofibroblastos. Estos últimos se encuentran incrementados en la fibrosis pulmonar y de manera importante, se caracterizan por tener una mayor capacidad para producir proteínas de matriz extracelular en comparación con fibroblastos (110). Además, los miofibroblastos presentan propiedades inherentes a las células de músculo liso, como la expresión de α actina de musculo liso, la cadena pesada de la miosina, etc. (30), y por lo tanto tienen propiedades contráctiles y participan en la distorsión de la arquitectura pulmonar y su pérdida de distensibilidad.

Los factores responsables de inducir *in vivo* un fenotipo migratorio, después proliferativo y finalmente un fenotipo de miofibroblastos en fibrosis pulmonar no se conocen con precisión.

Fibroblastos obtenidos de pulmones fibróticos muestran *in vitro*, una actividad

migratoria significativamente aumentada en comparación con fibroblastos de pulmones normales, en especial si se estimulan con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (90). De hecho, el PDGF es uno de los principales factores quimiotácticos para fibroblastos y se encuentra muy incrementado en pulmones con fibrosis pulmonar difusa (6).

En estudios realizados en fibrosis pulmonar experimental se ha demostrado una rápida inducción del receptor alfa del PDGF, el cual se expresa principalmente en las células mesenquimatosas que se encuentran localizadas en las lesiones fibróticas (17). Más recientemente se ha demostrado que ambos receptores, alfa y beta, promueven la migración de fibroblastos pulmonares e incluso que sus efectos son aditivos (107).

El PDGF estimula la quimiotaxis de fibroblastos de una manera dependiente de la concentración, y su estimulación puede ser potenciada por algunas citocinas como la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) (77). Otras moléculas que pueden participar en la migración de fibroblastos incluyen a la KL-6, la cual es sintetizada por células epiteliales y su efecto quimiotáctico potenciado por la fibronectina y el factor de crecimiento neuronal que estimula la migración de fibroblastos de piel y pulmón, sin influenciar la proliferación (39, 67).

Por otro lado, la proliferación de fibroblastos desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis pulmonar. Entre los factores capaces de inducir un incremento en la proliferación de estas células se encuentran factores que también influyen en su migración como el PDGF y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (54, 77).

Asimismo, se ha demostrado que el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) es altamente mitogénico para fibroblastos (21). De manera importante, este factor se encuentra sobre-expresado en fibroblastos de pulmones fibróticos y significativamente aumentado en el lavado bronquioalveolar de pacientes con diferentes tipos de fibrosis pulmonar (3,15,36).

Finalmente, el principal factor que se ha asociado al cambio de fenotipo de fibroblastos a miofibroblastos es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Este mediador se considera el prototipo de molécula profibrosante que no sólo participa en la acumulación excesiva de matriz extracelular sino además promueve la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos incrementando la expresión de la cadena alfa de músculo liso tanto *in vitro* como *in vivo* (23, 87).

Otros factores que también son capaces de inducir la diferenciación a miofibroblastos como por ejemplo el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), al parecer lo hacen a través de la inducción del TGF β (5, 105). Así, en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, el incremento del GM-CSF es seguido por un incremento en TGF β 1, y de su receptor tipo II, y posteriormente por la aparición de los miofibroblastos (5).

Remodelacion de la matriz extracelular

Los mecanismos moleculares involucrados en la exagerada acumulación de la matriz extracelular y la extensa desorganización estructural que caracteriza a la respuesta fibrótica, no han sido esclarecidos. Sin embargo, diversos estudios han sugerido que un desequilibrio local entre algunos miembros de la familia de las

metaloproteinasas de matriz (MMPs), y miembros de la familia de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) desempeña un papel importante (69, 72, 83).

Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC), es una mezcla compleja de colágena, otras glicoproteínas y proteoglicanos distribuidos en cada órgano o tejido en proporciones únicas. Estas moléculas tienen múltiples funciones entre las que destacan, a) su papel estructural: son el andamio para la formación y el crecimiento del tejido; b) regulación del comportamiento de las células del parénquima: a través de la unión a receptores celulares (integrinas), inician eventos de señalización intracelular; c) también se unen a factores de crecimiento y proporcionan concentraciones adecuadas de los mismos, los cuales son necesarios para la migración, proliferación y diferenciación de células epiteliales, endoteliales o mesenquimatosas (74).

Las colágenas son las proteínas más abundantes de la MEC; son moléculas homo o heterodímeras formadas por cadenas α de las cuales se han descrito 34 que han sido clonadas y secuenciadas; varias de ellas cuentan con corte y empalme alternativo. La secuencia de las cadenas α contienen un número variable de repeticiones Gly-X-Y (dominio COL), donde cerca del 30% de las posiciones X y Y, están ocupadas por prolina e hidroxiprolina.

A la fecha se han identificado en vertebrados 19 tipos diferentes de colágenas las que se pueden clasificar en dos principales grupos: las colágenas formadoras de fibras (colágenas I, II, III, V y IX); y el heterogéneo grupo de las colágenas no

fibrilares. En las colágenas fibrilares casi todo el largo de la cadena (300nm) está constituido por un simple dominio COL, mientras que las moléculas de las colágenas no fibrilares contienen varios dominios COL y NC (no colagénicos) de tamaño variable. En base a esto, se han descrito varias subfamilias, tales como las colágenas formadoras de redes (colágenas de membranas basales, IV, VIII y X); colágena microfibrilar VI; colágenas asociadas a fibras con interrupciones de triple hélice (FACIT: IX, XII, XIV, XVI, XIX); y las multiplexinas (dominios múltiples de triple hélice e interrupciones) XV y XVIII (7).

En el intersticio del parénquima pulmonar se encuentran principalmente las colágenas fibrilares tipos I y III, y en menor proporción las colágenas de tipo V y IX. En cuanto a las no colagénicas, la más abundante es la colágena de tipo IV que es el principal constituyente de las membranas basales; en menor proporción se encuentran las colágenas tipo VIII y X (7).

Otras moléculas que forman parte de la MEC, son los proteoglicanos, los cuales están compuestos por cadenas laterales de glicosaminoglicanos y una proteína central; ejemplos de ellos son la decorina, el biglicano, versican, agrecan, y perlecan. Otros importantes componentes de la matriz intersticial pulmonar son la fibronectina y la elastina que le proporciona su peculiar elasticidad. En las membranas basales, además de la colágena tipo IV se encuentran laminina, entactina, y algunos proteoglicanos, entre otros (7).

Metaloproteinasas de la matriz extracelular (mmps).

Las MMPs son una familia de endopeptidasas relacionadas estructuralmente, que requieren calcio y zinc para su funcionamiento, y son

capaces de digerir matriz extracelular y componentes de las membranas basales (104). Las MMPs tienen sus homólogos en otras especies tanto de animales como de plantas (16).

De acuerdo a su especificidad por el sustrato, estas enzimas han sido subclasificadas en los siguientes grupos funcionales:

-Colagenasas, con actividad sobre colágenas fibrilares. En este grupo se encuentran 3 enzimas: colagenasa 1 (MMP-1) que es expresada entre otras células por fibroblastos y macrófagos; colagenasa 2 (MMP-8), expresada por neutrófilos; y colagenasa 3 (MMP-13) descubierta en humanos en células derivadas de cáncer de mama. Los roedores como rata y ratón en estado adulto, solo expresan los correspondientes homólogos de MMP-8 y MMP-13, y únicamente en estado embrionario, expresan MMP-1 (11).

-Gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9, respectivamente). Estas MMPs tienen gran actividad sobre colágenas desnaturalizadas (gelatina), elastina y colágena tipo IV, que como se mencionó es un componente fundamental de las membranas basales.

-Estromelisin (MMP-3, MMP-10 y MMP-11): presentan actividad sobre un amplio espectro de componentes no colagénicos de la matriz extracelular como por ejemplo fibronectina y laminina.

-Matrilisin: Este subgrupo está formado por MMPs que sólo tienen 3 dominios, necesarios para su secreción, latencia y actividad catalítica. En este subgrupo se encuentran la matrilisina (MMP-7) y la recién clonada matrilisina 2 (MMP-26).

-MMPs asociadas a membranas (MT-MMPs). Estas son MMPs transmembranales, con una pequeña cola citoplásmica y un dominio tipo furina. Comprende a 6 miembros diferentes que son: MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP (MMP-17), MT5-MMP (MMP-24) y MT6-MMP (MMP-25). Tienen actividad contra algunas moléculas de la MEC, pero se le ha dado mucha relevancia a su papel en la activación de otros miembros de la familia de MMPs, como la MMP-2.

-Otras MMPs: que por sus propiedades no se pueden clasificar en los otros subgrupos, como la metaloelastasa de macrófagos (MMP-12), RASI (MMP-19), enamelisina (MMP-20) y epilisina (MMP-28).

Con excepción de las MT-MMPs, las MMPs son secretadas como proenzimas inactivas, requiriendo el corte de un propéptido para su activación. Una vez activadas en el espacio extracelular, son reguladas por una familia de proteínas conocidas como inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) (16, 102).

Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (Timp).

Existen 4 miembros (TIMP-1, -2, -3, y -4), los cuales están compuestos por 2 dominios, el dominio N-terminal, que consta de 125 aminoácidos y el dominio C-terminal de 65 residuos; cada dominio es estabilizado por 3 puentes disulfuro. Estas proteínas regulan la degradación de la matriz extracelular y membranas basales por las MMPs durante la remodelación tisular (16). Los TIMPs pueden formar complejos estables con las MMPs, generalmente en una proporción molar 1:1, aunque la fuerza de la unión varía y hay diferencias en las propiedades inhibitorias sobre MMPs y otras enzimas relacionadas; así por ejemplo, TIMP-2 y

TIMP-3, pero no TIMP-1, son inhibidores efectivos de las MT-MMPs; mientras que TIMP-3, pero no TIMP-2 o 4, es un buen inhibidor de la enzima convertidora del $TNF\alpha$ (TACE) (4, 16).

Es importante destacar que los TIMPs también participan en otros procesos biológicos, los cuales en la mayoría de los casos son independientes de sus actividades de inhibición de metaloproteinasas; por ejemplo TIMP-2 se une fuertemente al zimógeno pro-MMP-2 formando un complejo en la superficie celular con MT1-MMP, que activa a proMMP-2 (89). Por otro lado, la sobre-expresión de TIMP-2 en un modelo en ratón de cáncer pulmonar, ha mostrado que esta molécula es también capaz de disminuir la angiogénesis e inhibir el crecimiento tumoral y la formación de metástasis, (46). TIMP-2 también se ha reportado como inductor de apoptosis en linfocitos T (47). De manera interesante, TIMP-1 parece inhibir la muerte celular programada en células epiteliales de mama (50); también se ha demostrado que participa en rutas que permiten la supervivencia de células eritroides (43), en la inhibición de apoptosis de células mesangiales (48), y en la inducción de proliferación y morfogénesis de células epiteliales, durante el desarrollo mamario en ratón (25). En cuanto a TIMP-3, se demostró que su sobre-expresión induce apoptosis en células de músculo vascular liso de rata (8) y en células de melanoma, por estabilización de los receptores de muerte celular (2); asimismo, se ha asociado con muerte neuronal por isquemia-reperfusión (100). En relación al TIMP-4, aunque menos estudiado, se ha reportado que induce apoptosis en fibroblastos transformados procedentes de tumores de miocardio (93). En resumen, las actividades de estas proteínas son más complejas de lo que

se había pensado cuando se describieron, ya que además de sus propiedades inhibitorias sobre MMPs desempeñan otras funciones que en conjunto pueden participar en los procesos de acumulación de la matriz extracelular que se observa en la fibrosis pulmonar.

Factores de crecimiento

Varios factores de crecimiento participan en la regulación de los componentes de la matriz extracelular, en la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos y en la expresión de MMPs y TIMPs y a continuación se presentan brevemente aquellos que fueron investigados para esta tesis.

Como se mencionó previamente, el TGF- β 1 y el PDGF desempeñan un papel primordial en la fibrogénesis. El TGF- β 1, es un polipéptido homodímero de 25 kD que participa en un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo el desarrollo y la cicatrización y regula múltiples funciones celulares como por ejemplo el crecimiento, diferenciación y muerte celular (40). El TGF- β 1 estimula la acumulación de colágenas fibrilares a través de varios procesos implicados en la síntesis y degradación de las mismas. En este contexto, incrementa la transcripción del gen de la procolágena, y la estabilidad del RNA mensajero de la cadena α de colágena, inhibe la expresión de MMP-1, y estimula la producción de TIMP-1 (56,75).

Por otro lado, el PDGF es un potente mitógeno para células mesenquimatosas, principalmente miofibroblastos y ha sido implicado en fibrosis experimental y humana (6, 13, 49). Los PDGF son dímeros de cadenas A y/o B, y ejercen sus

funciones a través de dos receptores de tirosin cinasa, a y b. PDGF-A desempeña un papel crítico en el desarrollo del pulmón participando en la diferenciación de miofibroblastos alveolares y en la alveogénesis (19, 30).

El factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), es inducido por TGF- β 1, y participa en la proliferación de fibroblastos y en la inducción de la secreción de proteínas de matriz extracelular; este factor es un péptido rico en cisteínas de 36-38 kD y tiene un potente efecto mitogénico y de quimiotaxis para fibroblastos. Asimismo, induce en fibroblastos un incremento en la expresión de mRNA de la cadena α (I) de colágena, fibronectina, e integrina α 5 (40, 44). De manera importante, la expresión de este factor está incrementada en fibroblastos y en células del epitelio alveolar de pacientes con FPI (66).

Angiotensinogeno

La angiotensina II, es un péptido vasoactivo del sistema renina-angiotensina, que puede desempeñar un importante papel en fibrogénesis tisular. Entre otros efectos profibrosantes, este mediador induce proliferación de células mesenquimatosas, incluyendo fibroblastos pulmonares humanos, y aumenta la expresión de moléculas de MEC (53, 60, 82).

Algunos de estos efectos parecen ser mediados por la acción autocrina/paracrina del TGF- β 1 (82). Por otro lado, la angiotensina también parece estar involucrada en la apoptosis de células del epitelio alveolar (26, 54, 104). En nuestro laboratorio hemos demostrado que miofibroblastos pulmonares aislados de pacientes con

fibrosis pulmonar expresan angiotensinógeno y que este factor parece ser el responsable de la apoptosis del epitelio alveolar inducida por estas células (104).

Paraquat e hiperoxia.

El modelo experimental en el que se exploraron los mecanismos de fibrogénesis pulmonar en esta tesis se realizó con la combinación de paraquat e hiperoxia, la cual hemos demostrado que produce un grave daño en el parénquima pulmonar con el consecuente desarrollo de fibrosis (79, 80).

El paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bypiridinium dichloride) es un herbicida de contacto ampliamente utilizado en la agricultura el cual ha causado muchas muertes debido a su ingestión intencional o accidental. El daño primario en mamíferos ocurre en el pulmón, ya que el paraquat se acumula selectivamente en células epiteliales alveolares tipo I y II y en células de Clara en los bronquiólos respiratorios. La toxicidad del paraquat esta asociada con su capacidad para ser metabolizado a su radical libre (PQ^{\bullet}) de manera dependiente de NADPH, vía citocromo P-450 con la consecuente producción de anión superóxido (61, 64). Este anión puede formar peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo; este último radical es muy reactivo y daña la membrana celular, provocando la destrucción de la red capilar y la membrana alveolo-capilar. Este daño ocurre principalmente en el epitelio alveolar y/o el endotelio capilar lo cual incrementa la permeabilidad microvascular del pulmón, provocando un edema alveolar agudo rico en proteínas e hipoxemia sistémica (12, 61). Por estudios *in vitro*, se ha demostrado que el paraquat provoca apoptosis en células epiteliales A549 y en células HeLa (41).

En cuanto a la hiperoxia, se ha demostrado que el daño oxidativo al pulmón, está caracterizado por alteraciones de la barrera alveolo-capilar, en la cual se incrementa la permeabilidad a solutos, lo cual lleva a edema intra-alveolar e intersticial y falla respiratoria (37, 41, 68, 69). Aunque la toxicidad a oxígeno es atribuida a un incremento en la producción de especies de oxígeno reactivas, los mecanismos patogénicos no han sido completamente esclarecidos. Los procesos patológicos pueden involucrar la participación de las MMPs, ya que en ratas expuestas a 100% de oxígeno, se ha observado un incremento en la expresión de gelatinasas A y B (68). Adicionalmente, se ha demostrado *in vitro* que la hiperoxia mata a las células epiteliales por un proceso independiente de apoptosis (41).

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades fibrosantes del pulmón agrupan a un extenso y heterogéneo conjunto de padecimientos respiratorios que se caracterizan por comprometer difusamente al parénquima pulmonar, afectando primordialmente al intersticio y a los espacios alveolares.

Existen más de 150 diferentes enfermedades y/o agentes agresores que son capaces de producir fibrosis pulmonar, las cuales comparten el hecho de responder morfológicamente, después del daño inicial, con un proceso inflamatorio difuso o con activación epitelial persistente el cual puede ser seguido por fibrosis y destrucción de las unidades alveolo-capilares.

A pesar de múltiples estudios en modelos experimentales y en la enfermedad humana, los mecanismos patogénicos responsables de la respuesta fibrosante pulmonar no se conocen con precisión. Asimismo, es importante señalar que a la fecha no existe tratamiento curativo para este proceso, y en términos generales, cuando la fibrosis se desarrolla los enfermos presentan insuficiencia respiratoria progresiva, irreversible y letal.

En este contexto, es importante desarrollar estudios tanto en el área clínica como básica que permitan revelar los mecanismos por los cuales se desarrolla y progresa la fibrosis pulmonar. Un mejor conocimiento de la secuencia de los eventos patogénicos redituará en el hallazgo de medidas terapéuticas más adecuadas para mejorar el tiempo y la calidad de vida de los pacientes.

OBJETIVOS

Generales:

A) Desarrollar el modelo de fibrosis pulmonar en ratas con la combinación de paraquat e hiperoxia.

B) Determinar la expresión secuencial de colagenasas 2 y 3 (MMP-8 y MMP-13), gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9), TIMP-1, -2 y -3, TGF- β 1, CTGF, PDGF y angiotensinógeno durante el desarrollo del modelo experimental.

C) Determinar el tiempo de aparición y la localización de apoptosis en el tejido pulmonar, durante el desarrollo del modelo experimental.

Específicos:

a) Inducir fibrosis pulmonar en ratas mediante inyección intraperitoneal de paraquat y exposición permanente a una atmósfera de 80% de oxígeno durante todo el tiempo experimental.

b) Determinar el contenido de colágena pulmonar mediante la cuantificación de hidroxiprolina y el grado y tipo de lesión en cortes histológicos pulmonares teñidos con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson.

c) Analizar la expresión génica de las moléculas seleccionadas por medio de transcripción inversa (RT) y PCR en tiempo real.

d) Evaluar las moléculas que se encuentran incrementadas a nivel génico por ELISA o inmunohistoquímica.

e) Determinar la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9, por zimografía en extractos de tejido pulmonar.

f) Localizar la presencia de células apoptóticas en cortes histológicos pulmonares por detección de fragmentación de DNA *in situ*.

Material y Metodos

Modelo experimental.

El modelo experimental de fibrosis pulmonar difusa fue desarrollado como se describió previamente (80, 81). Ratas Wistar macho adultas, con un peso de 200-250 gramos recibieron 2.5 mg/Kg de paraquat (1, 1'- dimethyl -4, 4-bipyridinium) tres veces a la semana durante 6 semanas. La droga fue administrada en 1.5 ml de solución salina por vía intraperitoneal. Durante estas 6 semanas las ratas experimentales fueron sometidas a hiperoxia continua. Para este propósito, los animales fueron colocados en cámaras de acrílico de 160 cm³, las cuales fueron ventiladas de manera permanente con una mezcla de aire y oxígeno manteniendo una concentración constante de oxígeno del 80%. En estas cámaras los animales tenían el espacio suficiente para moverse libremente así como acceso a comida y agua sin restricciones. Los animales control recibieron inyecciones de solución salina intraperitoneal y fueron expuestos a aire atmosférico durante todo el experimento.

Los animales se inspeccionaron diariamente para observar sus condiciones generales y el peso corporal se registró cada tercer día. Las ratas expuestas a paraquat e hiperoxia fueron sacrificadas a las 1, 2, 3, y 6 semanas de exposición. Se utilizaron 8 ratas en cada tiempo. Los animales controles fueron sacrificados a intervalos iguales que los experimentales. Como no se observaron cambios

significativos en el contenido de colágena ni en la histología, se seleccionaron al azar dos de cada tiempo para constituir un solo grupo control de 8 animales.

Alrededor del 80% de los animales experimentales mostraron una disminución progresiva de peso corporal junto con insuficiencia respiratoria manifestada por bradipnea y/o cianosis. Estas ratas fueron denominadas susceptibles. El 20% restante subió de peso y no mostró evidencia de insuficiencia respiratoria durante las 6 semanas del experimento. Al sacrificio, el estudio morfológico reveló ausencia o mínimas lesiones pulmonares. A estas ratas se las denominó resistentes y 8 de ellas también fueron estudiadas.

Después del sacrificio, los pulmones fueron extraídos y el izquierdo se utilizó para morfología, inmunohistoquímica, localización de apoptosis y determinación de colágena y el pulmón derecho se utilizó para zimografía, ELISA, Northern blot y RT-PCR.

Morfología.

Los pulmones fueron instilados con paraformaldehído al 4% en PBS a 20cm de H₂O de presión constante y posteriormente se continuó la fijación por 2 horas en la misma solución para terminar con tres lavados de 15 minutos en PBS. Los tejidos se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol 30, 50, 70, 80, 96% y finalmente en etanol absoluto, 30 minutos en cada paso, luego en xilol por 30 minutos, y finalmente se incluyeron en parafina. Se utilizaron cortes de 3 μ m los cuales se tiñeron con hematoxilina & eosina y tricrómica de Masson, como se ha descrito previamente (85).

Detección de fragmentación de DNA in situ (Apoptosis).

La muerte celular por apoptosis fue explorada en los tejidos pulmonares con un estuche de detección de fragmentación de DNA (Klenow-FragEL™, Oncogen, Darmstadt, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los cortes histológicos del pulmón fueron montados en portaobjetos, desparafinados y rehidratados, e incubados con 100µl de 20µg/ml de Proteinasa K a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, los tejidos se lavaron con TBS 1X y se incubaron con 1 µg/µl de DNAsa I en TBS 1X/1mM MgSO₄ a temperatura ambiente por 10 minutos. La peroxidasa endógena fue inactivada en una solución de H₂O₂ al 3% en metanol (Sigma Chemical, St. Louis, MO) por 30 minutos a 20°C. Los especímenes fueron cubiertos con un amortiguador de equilibrio a temperatura ambiente por 30 minutos, y posteriormente se agregó 60µl de una mezcla de reacción de marcaje que contiene Klenow. Las laminillas fueron incubadas en una cámara húmeda a 37°C por 1.5 horas. Finalmente, los tejidos pulmonares se cubrieron con 100 µl de una solución amortiguadora de bloqueo a temperatura ambiente por 10 minutos, y entonces se incubaron con 100µl de diaminobencidina a temperatura ambiente por 15 minutos, y se contratiñeron con 100µl de verde metilo.

Cuantificación de Hidroxiprolina

Después de hacer los cortes histológicos que se utilizaron para morfología, detección de apoptosis e inmunohistoquímica, el tejido restante se desparafinó y se utilizó para analizar el contenido de hidroxiprolina como un estimado del

contenido de colágena. Los tejidos fueron puestos a secar en una estufa a 80°C, pesados diariamente hasta obtener un peso constante, y posteriormente se hidrolizaron en 12 N HCl por 24 horas a 110°C. El contenido de hidroxiprolina se midió por un análisis colorimétrico descrito por Woessner (102), el cual consiste en filtrar las muestras hidrolizadas, llevarlas a sequedad, resuspenderlas en 2 ml de agua y llevarlas a pH 7.0 con NaOH, y posteriormente a un volumen de 10 ml con agua desionizada. Para la determinación se preparó una curva patrón con concentraciones conocidas de hidroxiprolina, desde 200µg hasta 1mg. De las muestras experimentales se utilizaron 100µl, que se llevaron a un volumen de 1ml; posteriormente se agregó 1ml de solución de cloramina T 0.05M por 20 minutos a temperatura ambiente y enseguida se agregó 1ml de ácido perclórico 2.5N y finalmente 1ml de una solución de para-dimetilaminobenzaldehído al 20% en metilcelosolve con lo que las muestras se dejaron incubando durante 20 minutos a 60°C. Transcurrido ese tiempo se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 560nm en un espectrofotómetro (DU-6, Beckman). Los resultados obtenidos se expresaron como microgramos de hidroxiprolina por gramo de tejido seco.

Inmunohistoquímica para TIMP-1.

La proteína TIMP-1 inmunoreactiva se identificó en los tejidos pulmonares siguiendo un método que hemos descrito previamente (72). Después de rehidratar los tejidos montados en las laminillas, éstos fueron bloqueados con H₂O₂ al 3% en metanol, seguido por la incubación de las laminillas en amortiguador de citratos 10mM pH 6.0 durante 5 minutos en horno de micro-ondas a máximo poder para facilitar la revelación del antígeno. Los tejidos fueron tratados con un diluyente de

anticuerpos que está compuesto de sustancias reductoras de fondo (Dako, Carpinteira, CA) diluido 1:100 en PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-TIMP-1 (Santa Cruz, CA) diluido 1:1000 en PBS, por 16 horas a 4°C. Después de ese tiempo las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado, anti-inmunoglobulina (Santa Cruz, CA), seguido por un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano (Biogenx, San Ramo CA), utilizadas de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante; como sustrato se utilizó 3-amino-etilcarbazol (AEC, BioGenx) en amortiguador de acetatos con 0.05% de H₂O₂.

Para mejorar la visualización de los tejidos, las laminillas fueron contrateñidas con hematoxilina. Para los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por suero no inmune.

Zimografía de tejidos pulmonares.

Aproximadamente 50 mg de pulmón de los animales experimentales y controles fueron homogenizados en una solución de 10mM de CHAPS (3-[3-Cholamidopropyl]dimethylammonio] 2-hydroxy-1-propanesulfonato; Sigma Chemical Co., St Louis, Mo), HEPES 20mM pH 7.5 y NaCl 150mM utilizando un homogenizador (polytron, PT 10/35, Kinematica). Las muestras se centrifugaron a 12,000g por 30 minutos, después de lo cual se separó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas totales con el método de Bradford.

Posteriormente se prepararon geles para zimografía como previamente hemos descrito (68, 71) los cuales están compuestos de acrilamida al 8.5%–SDS 0.1% y contienen gelatina al 1% como sustrato. En estos geles se cargaron 10µg de

proteína de cada muestra mezclados con amortiguador de carga (glicerol 10%, azul de bromofenol 0.05% y Tris 62.5mM). Como control positivo para gelatinasa A (MMP-2) se utilizó medio condicionado de fibroblastos humanos, y para gelatinasa B (MMP-9) medio condicionado de células U2-OS estimuladas con PMA. Los geles se corrieron durante 2 horas a 150mV, y luego se incubaron 2 veces con 50ml de tritón al 2.5% en H₂O durante 15 minutos, con agitación constante y a temperatura ambiente; enseguida se dejaron incubando en 100 ml de amortiguador de sustrato (Glicina 0.1M, CaCl₂·2H₂O 5mM y ZnCl₂ 0.25mM) durante 24 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo los geles se tiñeron con una solución de tinción (azul de coomassie R-250 0.3mM, metanol 40% v/v, ácido acético glacial 7% v/v, en agua desionizada) durante una hora en agitación constante. Posteriormente esta solución fue eliminada y se agregó una solución desteñidora (metanol 10%, ácido acético glacial 10%, en agua desionizada), durante 2 horas o hasta observar las bandas de actividad gelatinolítica.

Para comprobar que las bandas observadas se debían a la actividad de metaloproteinasas de matriz, se corrieron geles en paralelo, los cuales fueron incubados con amortiguador de sustrato que contenía 20mM de EDTA, un quelante de cationes divalentes como zinc y calcio que inhibe la actividad de las MMPs; en estos geles no se observó actividad gelatinolítica. Las bandas de actividad fueron cuantificadas utilizando un software de análisis de imágenes ID (Eastman Kodak Rochester, NY), considerando el área y la intensidad de las bandas de lisis. Los resultados fueron expresados como unidades relativas (intensidad neta/10mg de proteína de tejido pulmonar).

Cuantificación de TGFβ1 por ELISA

Se utilizaron alícuotas de los extractos pulmonares que se hicieron con CHAPS para zimografía. Para determinar la cantidad de TGFβ1 nativamente activo se analizó cada muestra directamente, y para determinar el TGFβ1 total, se tomaron alícuotas a la par, las cuales se activaron con 1μl de HCl 1N por cada 50μl de muestra utilizada diluida previamente en DPBS (Dulbecco's PBS) 1:5, de 15 a 20 minutos, seguido por neutralización con 1 μl de NaOH 1N. Posteriormente se procedió a cuantificar el TGFβ1 con un estuche comercial (Promega, Madison, WI), de acuerdo a las instrucciones del fabricante de la siguiente manera: Se agregaron 100μl del anticuerpo primario monoclonal previamente diluido 1:2 en amortiguador de carbonatos a la placa de ELISA, e incubaron 12 horas a 4°C; se retiró el anticuerpo y enseguida se bloquearon los sitios no específicos con 200μl de un amortiguador de bloqueo 37°C por 35 minutos; se retiró el amortiguador de bloqueo y se agregó la curva estándar a los pozos destinados (100μl por pozo) en diluciones seriales, por duplicado (1000, 500, 250, 125, 62 y 15.6 pg/ml); de igual manera se hicieron las diluciones de las muestras problema (1:25) y se pusieron 100μl por duplicado; enseguida la placa se incubó a temperatura ambiente por 1.5 horas con agitación, se lavaron 5 veces con amortiguador de lavado, se colocaron 100μl del anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal anti-TGFβ1) y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 5 veces y se agregaron 100μl de un conjugado TGFβ1-HRP (peroxidasa de rábano) dejando en agitación por 2 horas y después de 5 nuevos lavados se agregaron 100μl por pozo de TMB durante 15 minutos a temperatura ambiente sin agitación; por último

la reacción se detuvo agregando 100 μ l de HCl 1N y se procedió a leer la placa a una longitud de onda de 450nm en un lector de ELISA. Se graficó la absorbancia obtenida de los estándares versus las concentraciones de los mismos y se interpolaron los datos procedentes de las muestras problema para obtener sus concentraciones respectivas.

Northern blot.

Se obtuvo el RNA total de una fracción del pulmón por el método de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cantidad del RNA fue determinada utilizando 2 μ l de RNA en 50 μ l de H₂O-DEPC (agua tratada con dietil pirocarbonato) y leyendo a longitudes de onda de 260nm/280nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, MBA 2000), tomando en consideración que 1 D.O. de una solución de RNA equivale a 40 μ g/ml; la pureza se determinó obteniendo una proporción de las lecturas 260nm/280nm, ya que a 280nm se leen las proteínas. La integridad del RNA se determinó de la siguiente manera: 2 μ g de RNA se mezclaron en una solución de 50% de formamida, 6.5% de formaldehído y 10% de amortiguador de corrida (0.1M de MOPS, 40mM de acetato de sodio y 5mM de EDTA pH 8.0; esta solución se calentó a 65°C por 15 minutos y se colocó inmediatamente en hielo; posteriormente la mezcla se resolvió en un gel de agarosa al 1% en condiciones reductoras (con formaldehído 2.2mM, 20% de amortiguador de corrida) y finalmente se tiñó con bromuro de etidio. En el gel se deben observar los RNAs ribosomales 28s y 18s lo cual demuestra una buena integridad.

Para realizar el Northern blot se utilizaron 15 μ g de RNA y se procedió como se hemos descrito previamente (13). Después de la electroforesis, el gel se lavó 2 veces con SSC 2X durante 15 minutos, y se puso en contacto con una membrana de transferencia Nytran (NEN Life Science Products Inc., Boston, MA) para transferir el RNA por capilaridad a la membrana, la cual se lavó brevemente con SSC 6X, se secó al aire por 30 minutos y se colocó a 80°C por 2 h para fijar al RNA.

La prehibridación se llevó a cabo a 42°C por 18 h en una solución amortiguadora de hibridación que consiste en: 5X SSC, 50% formamida, 5X de solución de Denhardt, 0.5% SDS, 100 μ g/ml esperma de salmón desnaturalizado, fosfato de sodio pH 7.0 50mM y lauroilsarcosina al 0.1%, en una bolsa de hibridación con 2ml del amortiguador por cada 10 cm² de superficie de membrana.

Posteriormente se eliminó la solución de prehibridación y se agregó la solución de hibridación que contenía el cDNA de la cadena α 2(I) de colágena o de TIMP-1, en 50% de sulfato de dextrán, el cual se había marcado con ³²P dCTP con una actividad específica de 200 x 10⁶ dpm/ μ g usando un estuche de marcaje de DNA (Dupont NEP-103, Wilmington, DE). El tiempo de hibridación fue de 18 horas a 42°C. Después de la hibridación, las membranas, se lavaron con SSC 2X, SDS 0.1% a 42°C por 25 minutos, seguido por 2 lavados a 55° C por 15 minutos, con SSC 0.1X y SDS 0.1%. Las membranas se expusieron con un film Kodak BIOMAX MS a -70 °C, en una pantalla intensificadora. También se hizo un monitoreo de la expresión de mRNA del gen constitutivo gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), para normalizar la expresión de TIMP-1 y cadena α (2)1 de colágena

tipo I.

RT y PCR en tiempo real.

Un microgramo de RNA fue tratado con una unidad de DNAsa (Life Technologies, Grand Island, NY), durante 15 minutos, posteriormente se le agregó 1µl de EDTA 25mM y se incubó a 65°C para inactivar la DNAsa. El cDNA se sintetizó por medio de transcripción reversa, utilizando el estuche *Advantage RT-for-PCR* (Clontech, Palo Alto CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante que a continuación se describen: 1µg de RNA previamente tratado con DNAsa, fue mezclado con una solución que consiste en amortiguador (KCl 75mM, MgCl₂ 3mM, y Tris-HCl 50mM, pH 8.3), 20pmol de hexámeros iniciadores, una mezcla de nucleótidos de concentración 10mM de cada uno (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 20 unidades de inhibidor de RNAsas recombinante y 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa (Moloney-Murine Leukemia Virus reverse transcriptase) y llevada a 20µl de solución final con H₂O-DEPC. Una vez sintetizado el cDNA se procedió a realizar PCR en tiempo real, utilizando el sistema i-Cycler iQ Detection System (BioRad, Hercules, CA). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25µl, el cual contenía: 3µl de cDNA o 1 µl del estándar, 20mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM de KCl, 2mM de MgCl₂, una mezcla de nucleótidos 200µM de cada uno, 1µM de cada iniciador específico (tabla1), 1.25 unidades de la enzima *Taq Gold PCR* (Roche, Branchburg, NJ), 10nM de fluoresceína, 1X de SYBR GREEN I (Molecular Probes, Eugen, OR) y se llevó a 25 microlitros con agua estéril filtrada. Se construyó una curva estándar para cada gen con cada producto específico de PCR, lo cual se realizó de la siguiente manera: se amplificó con los

iniciadores específicos de cada gen de interés, los productos se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, y las bandas específicas fueron cortadas del gel y se purificaron con el estuche de *Quiagen II gel extraction* (Quiagen, Valencia, CA). Después, con el producto purificado se construyó un rango dinámico de amplificación con diluciones seriales que iban desde 1×10^8 , 1×10^6 , 1×10^4 y 1×10^2 número de copias; tanto los estándares como los cDNAs fueron amplificados por triplicado. Las ecuaciones de las curvas estándar fueron calculadas refiriéndose al ciclo umbral (Ct), el cual está definido como el ciclo en el cual todas las muestras están en la fase de amplificación exponencial; este ciclo umbral se graficó versus el logaritmo base 10 (\log_{10}) del número de copias de cada estándar, obteniéndose la pendiente de la recta (m) y la ordenada al origen (b) de la curva estándar la cual está definida como: $x=(y-b)/m$ es decir **\log_{10} número de copias=(Ct-b)/m**, y el número de copias de cada muestra problema. Los resultados se expresaron como el número de copias de cada gen normalizado con el número de copias del RNA ribosomal 18s (78, 88). Algunos iniciadores usados para las reacciones de PCR se tomaron de secuencias publicadas (24,62,78,101) y el resto fueron diseñadas con un software perteneciente al Instituto Pasteur, al cual se tuvo acceso por medio de la siguiente dirección electrónica: "<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/eprimer3.html>". Para evitar amplificaciones inespecíficas derivadas de la probable homología de los iniciadores con secuencias de otros genes, la homología de los iniciadores se verificó en el BLAST (Basic Local Alignment Search). Todos los iniciadores fueron obtenidos de Gibco BRL (Life Technologies, Grand Island, NY). Las condiciones de ciclaje para las amplificaciones de MMP-2, MMP-9, MMP-13, CTGF, PDGF-A y angiotensinógeno fueron llevadas a cabo utilizando el siguiente

protocolo: 95°C/7 min.; 40 ciclos de 3 pasos cada uno: desnaturalización a 95°C/30s, alineamiento de iniciadores a 58°C/30s y un paso de extensión a 72°C/30s. Después de esto se corrió un protocolo para confirmar amplificación específica denominado curva de fusión (*melt curve*), el cual consistió en un paso inicial a 95°C/15s, un segundo paso a 60°C/20s y por último un incremento de 0.5°C cada 30s de 60°C a 95°C, con monitoreo de la fluorescencia; la especificidad fue confirmada por la presencia de un solo pico en las gráficas correspondientes. Adicionalmente los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5%. Para la amplificación de TIMP-1, -2, -3, y TGFβ1, se utilizaron las mismas condiciones excepto que la temperatura de alineación de los iniciadores fue de 60°C.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y como prueba *post hoc*, se utilizó la prueba de Dunnett. Se consideró significativo el valor de $p \leq 0.05$.

Tabla 1

Genes e iniciadores para PCR

Gen	Iniciador sentido (5' a 3')	Iniciador antisentido (5' a 3')	Pares de bases	Referencia o número de acceso (gene bank)
R18s	GTAACCCCGTTGAACCCC ATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	140	Schmittgen et al, 2000
MMP-13	CATCCATCCCAGAGAC CTCAT	GCATGACTCTCACAATGCCGA	324	M60616
MMP-2	CTATTCTGTCAGCACTTT GG	CAGACTTTGGTCTCCAACCTT	309	Wells et al, 1996
MMP-8	CCCACCTGAGATTGT ATGCT	TTCTTGCAAGTCATAGGCAC	235	AJ007288
MMP-9	AAATGTGGGTGTACA CAGGC	TCCTTGGGGCTCTCAATTTC	309	Wells et al, 1996
TIMP-1	GACCACCTTATACC-AGC GTT	GTCACTCTCCAGTTTGCAAG	333	L29512
TIMP-2	CAACCCCATCAAGAG GATTC	CGCAAGAACCATCACTTCTC	416	U14526
TIMP-3	CAGTACATTACACGGA AGC	TCTGTGGCATTGCTGATGCT	392	NM000362
TGFβ1	TGGAAGTGGATCCACGC GCCCAAGG	GCAGGAGCGCACGATCATGTTG GAC	242	NAPOLI J,1997
PDGF-A	AAGCATGTGCCGGAGAA GCG	TCCTCTAACCTCACCTGGAC	305	DOBRIAN A, 1999
CTGF	CCG GAT CCG AGC TTT CTG GCT GCA CC	GGC TGC AGT CTC CGT ACA TCT TCC TG	250	Donada por el Dr.Lasky, Tulane, University
Angiotensin- nógeno	GTTTGTTTGGACACTGGG GT	ACAAGGGGACAGTGTGCATT	174	M121112.1

RESULTADOS

Características generales

Las ratas que recibieron el tratamiento de paraquat e hiperoxia se caracterizaron por presentar dos tipos de respuestas clínico/morfológicas. Los animales a los que se les denominó susceptibles mostraron constante pérdida de peso corporal y datos de insuficiencia respiratoria; algunas de estas ratas sufrieron una grave pérdida de peso e intensa, falla respiratoria entre la primera y segunda semanas de exposición. Por otra parte, aproximadamente el 20% de los animales expuestos no presentaron pérdida de peso, aunque no crecieron en la misma proporción que los controles (Tabla 2) y no mostraron síntomas respiratorios que los distinguieran de los animales control durante las seis semanas de exposición; a estos animales se les denominó resistentes.

Tabla 2

Peso corporal al sacrificio (g)

Ratas	0 semanas	1 semana	2 semanas	3 semanas	6 semanas
Control	198 \pm 13	207 \pm 4	252 \pm 16	278 \pm 14	291 \pm 15
Susceptibles	207 \pm 11	190 \pm 18	185 \pm 9	170 \pm 10	165 \pm 16
Resistentes	202 \pm 9	205 \pm 11	223 \pm 14	236 \pm 17	264 \pm 15

Los valores están expresados como media \pm error estándar.

Cambios morfológicos

Un ejemplo representativo de la evolución histopatológica del parénquima pulmonar en cada tiempo, se muestra en la figura 2. Los animales control exhibieron una arquitectura alveolar normal (figura 2A). Durante la primera semana de exposición a paraquat e hiperoxia, se observó inflamación multifocal

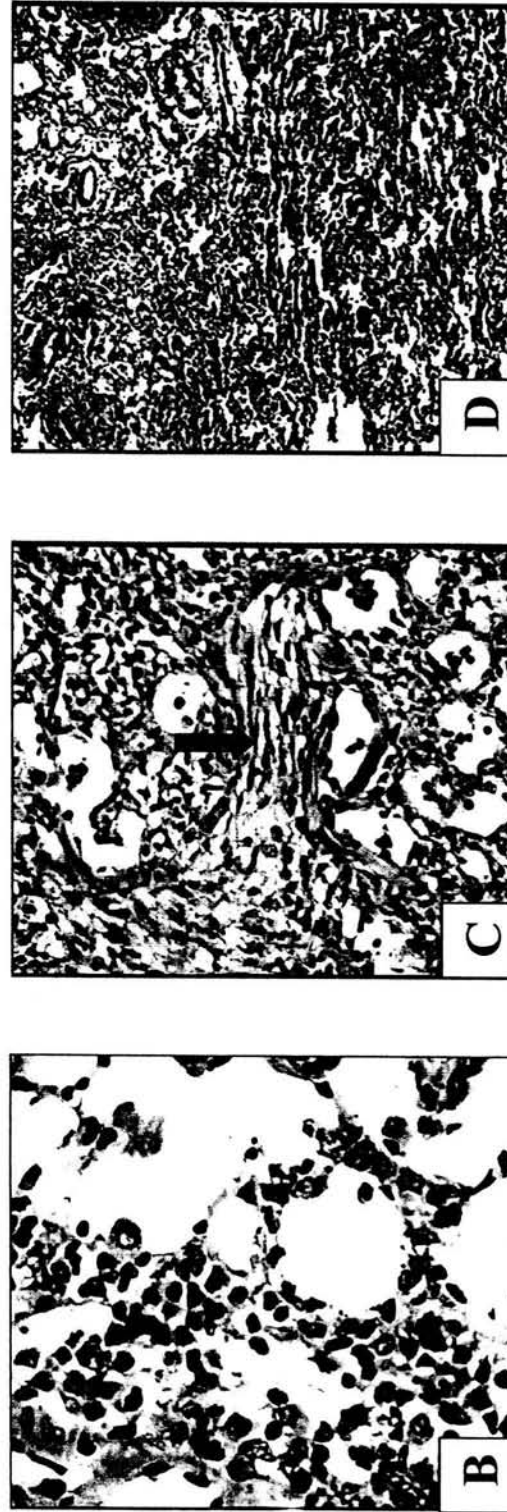
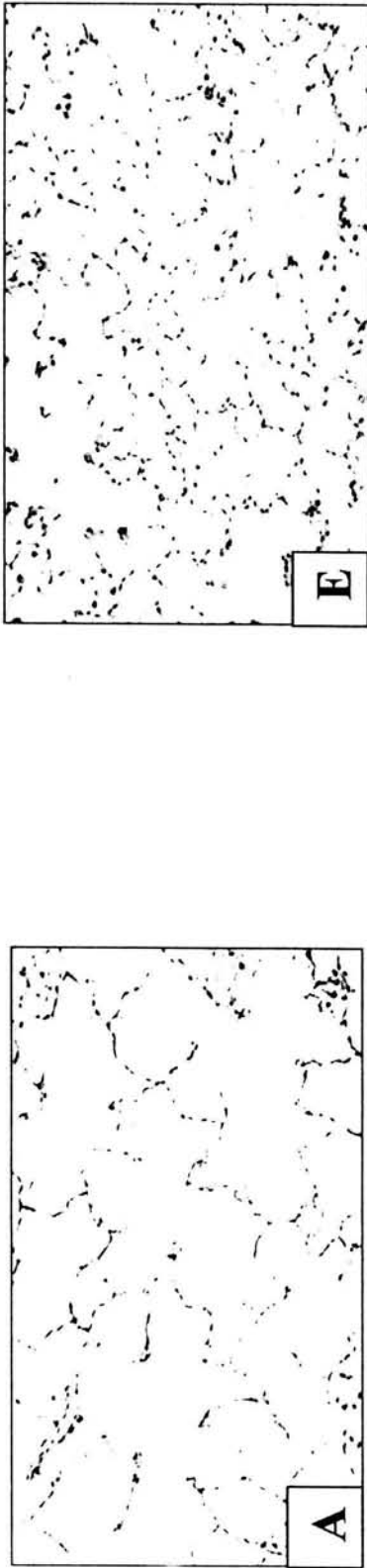


Figura 2: Histología de pulmones normales y experimentales. Secciones de pulmón de los animales sacrificados a diferentes intervalos de tiempo fueron teñidos con hematoxilina-eosina (paneles A, B, C y E) y tricrómica de Masson (panel D). Aumento original; paneles A y C 20X; B 40X; D and E 10X) La flecha verde en C indica un foco de fibroblastos.

intersticial y alveolar, así como cuboidalización del epitelio alveolar por hiperplasia de neumocitos tipo 2. La inflamación se caracterizó por la presencia de células mononucleares y numerosos polimorfonucleares (figura 2B). A las 2 y 3 semanas de exposición, el proceso inflamatorio fue predominantemente mononuclear, con linfocitos y macrófagos intersticiales e intra-alveolares; desde este tiempo se encontraron también fibroblastos intersticiales densamente agrupados (figura 2C flecha). A las 6 semanas de la doble agresión, el infiltrado celular fue similar, pero se observó un depósito de colágena más extenso que en las semanas previas, así como una grave pérdida de la arquitectura del parénquima pulmonar (figura 2D). Los animales resistentes exhibieron estructuras alveolares normales con mínima o ninguna presencia de inflamación o fibrosis, y en general mostraron características similares a los controles (figura 2E).

Expresión y contenido de colágena

Este estudio corroboró los hallazgos morfológicos de fibrosis. Las ratas susceptibles mostraron un progresivo incremento de colágena pulmonar a lo largo del experimento, comparado con los animales control. En la figura 3A, se observa que el contenido de hidroxiprolina (el cual refleja el contenido de colágena) aumenta aproximadamente un 50% sobre el grupo control, a las tercera y sexta semana de exposición a paraquat e hiperoxia ($P < 0.05$). Como puede apreciarse, el grupo de las ratas resistentes se comportó como el grupo control.

Similares resultados se obtuvieron a nivel génico. Como se observa en la figura 3B, los niveles de expresión del transcrito de la cadena pro- α_1 de colágena tipo I se incrementaron en la tercera y sexta semanas de evolución.

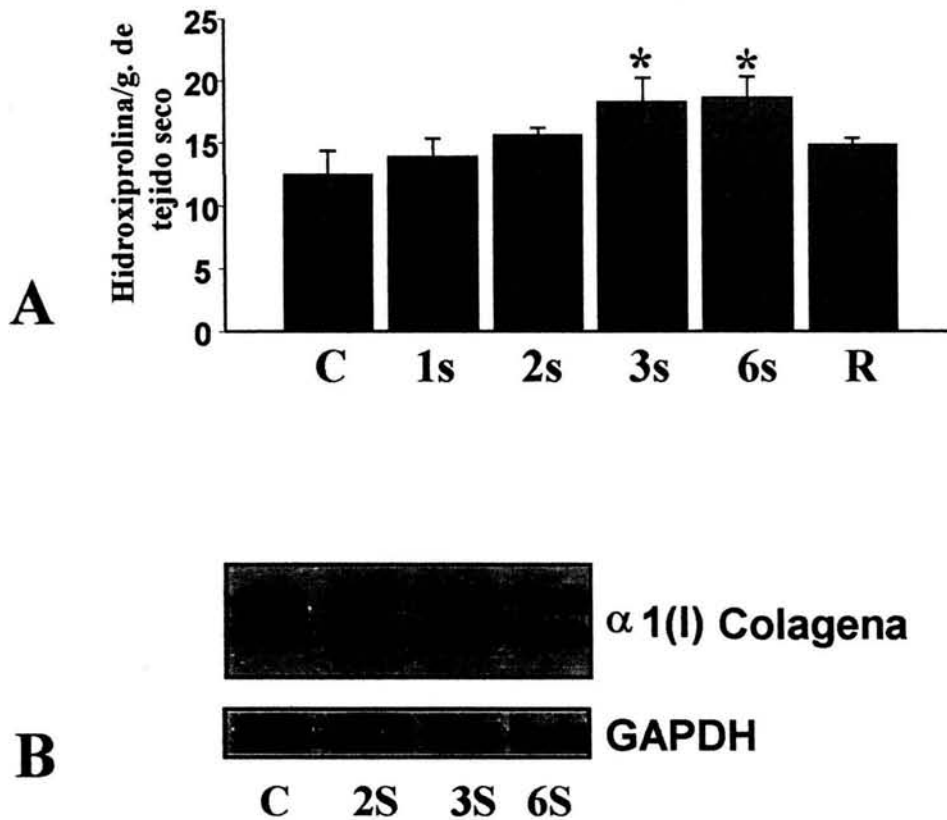


Figura 3: Cuantificación de hidroxiprolina de tejido pulmonar pulmonar y expresión génica de colágena..

Panel superior: Contenido relativo de hidroxiprolina por peso seco. Se puede observar un incremento significativo de hidroxiprolina en la tercera y sexta semanas de exposición a paraquat e hiperoxia. Los animales resistentes se comportaron como los controles. * $P < 0.05$.

Panel inferior: Análisis por Northern blot, el cual muestra una sobre-regulación de la expresión de la cadena α (I) de colágena en la tercera y la sexta semanas.

Fragmentación de DNA in situ (Apoptosis)

Este estudio mostró la presencia de células apoptóticas desde la primera semana hasta el fin del estudio. La apoptosis fue distribuida difusamente en el parénquima pulmonar y fue principalmente observada en el epitelio alveolar y en células del epitelio bronquiolar (figuras 4A, 4B y 4C). Asimismo, se observaron áreas intra-alveolares con células inflamatorias apoptóticas a lo largo de todo el experimento. A las 6 semanas de exposición a paraquat e hiperoxia, numerosas células intersticiales también mostraron signos de apoptosis (figura 4D). Las ratas resistentes se comportaron como los controles (figura 4E) y en términos generales se encontraron escasas o ninguna célula apoptótica pulmonar.

Cuantificación del RNA ribosomal 18s por PCR en tiempo real

En la figura 5 se muestra un ejemplo de un experimento con PCR en tiempo real para la cuantificación del RNA ribosomal 18s, el cual fue tomado como control interno de expresión génica, es decir como gen de expresión constitutiva. En la figura 5A se grafica fluorescencia (CF RFU) eje de las abscisas contra número de ciclos, eje de las ordenadas; cada línea describe a una muestra. Como puede observarse figura 5B, donde se grafica el ciclo umbral (Threshold) vs el logaritmo inicial del número de copias, la reacción fue lineal sobre 9 órdenes de magnitud de la amplificación de las diferentes concentraciones de los estándares, con una sensibilidad de detección de hasta 10 moléculas y una eficiencia del 93%. El coeficiente de correlación fue de 0.99. La figura 5C ilustra la gráfica de la curva de fusión (*melt curve*), de los cDNAs amplificados (figura 5A), la cual demuestra la

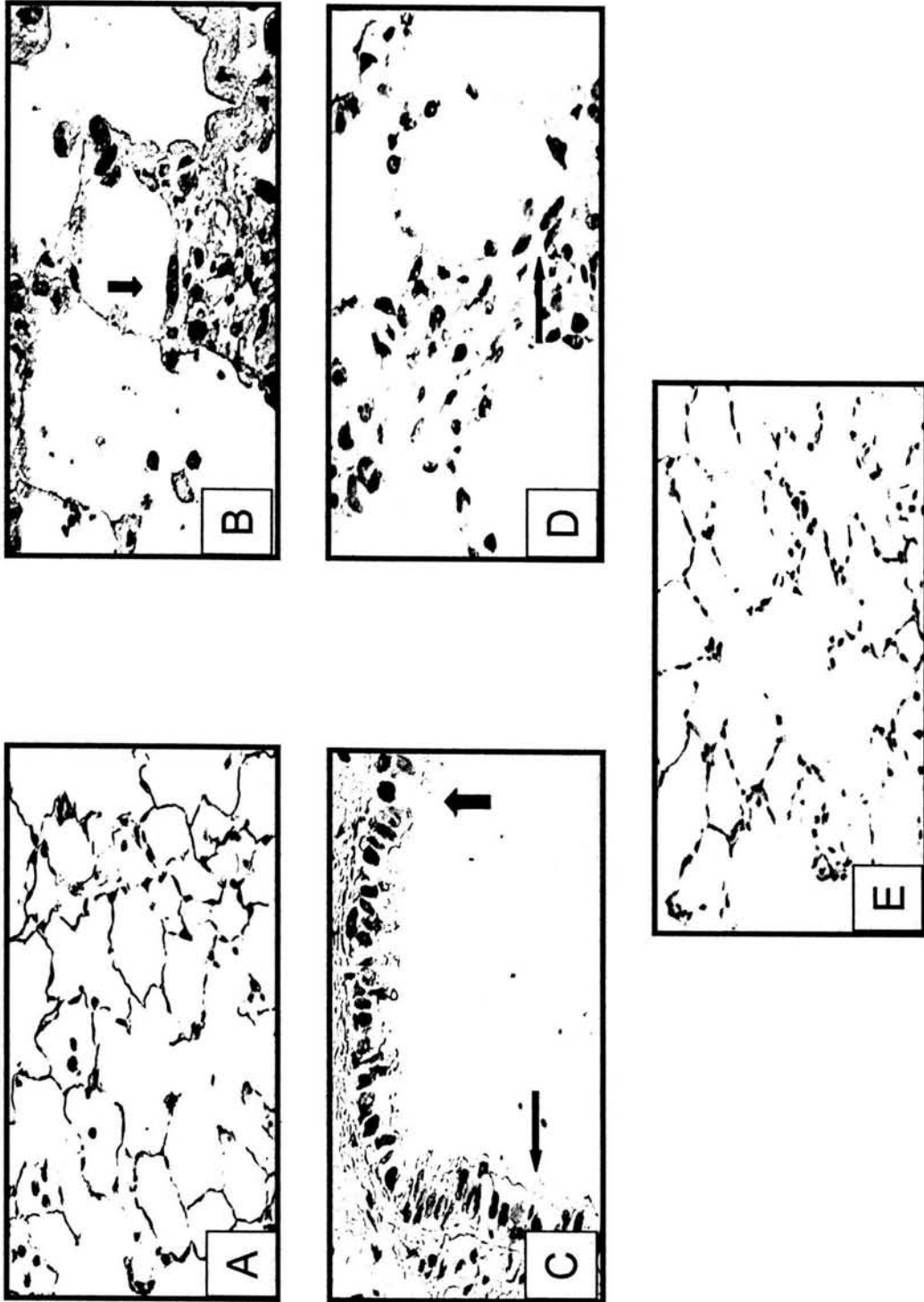


Figura 4. Fragmentación de DNA *in situ*:

En verde se encuentran teñidos los núcleos de células vivas, en café los de células en proceso de apoptosis (flechas negras). Panel A, control; panel B, 1 semana; panel C, 3 semanas; panel D, 6 semanas; y panel E, resistente. Aumento original, paneles A y E, 20X; y B-D 40X.

Fig. 5A

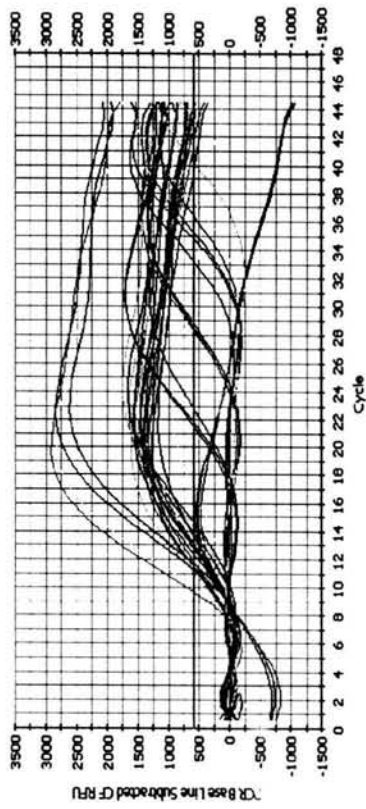


Fig. 5B

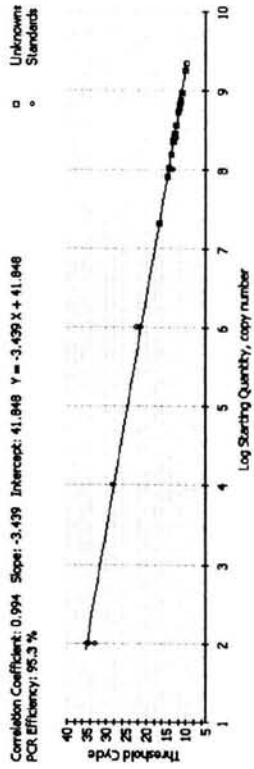


Fig. 5C

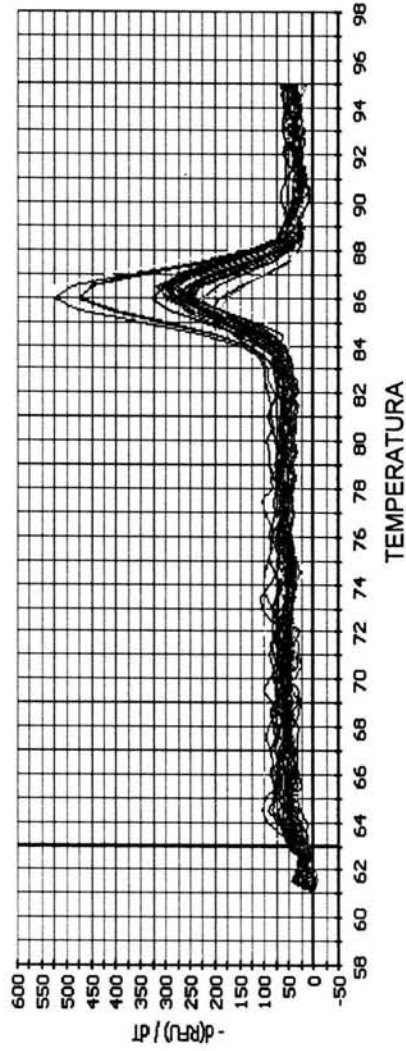


Figura 5: Cuantificación de la expresión génica para rRNA18s por PCR en tiempo real.
Fig.5A: Amplificación de rRNA 18s detectado con los cambios en la fluorescencia (CF RFU) en un experimento de PCR en tiempo real. Se ensayaron 25 muestras por triplicado y 5 cDNAs estándar, cada línea representa a una muestra. Fig.5B: Curva estándar donde se graficó el ciclo umbral contra el log de las concentraciones conocidas de los estándares. Fig.5C: Gráfica de la curva de fusión que representa la amplificación de un sólo producto específico.

amplificación de un solo producto específico, ya que solo se observa un pico para cada línea.

Como se analiza a continuación, los niveles de expresión de los diferentes genes analizados en este trabajo, fueron selectivos y mostraron diferencias temporales.

Cuantificación de la expresión génica para metaloproteinasas de matriz (MMP) por PCR en tiempo real.

En relación a las 4 MMPs estudiadas, el efecto mas marcado fue una reducción significativa en la expresión de mRNA de ambas colagenasas MMP-8 y MMP-13. Esta observación fue evidente desde la primera hasta la sexta semana en ambas enzimas alcanzando diferencias significativas que oscilaron entre $P < 0.05$ a $P < 0.01$ (figuras 6A y 6B). El comportamiento de las ratas resistentes en relación a la expresión de las dos colagenasas fue similar a las ratas control. Por el contrario, la expresión del mRNA de las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9) no mostró cambios significativos entre el grupo control y los experimentales (figuras 7A y 7B).

Detección de la actividad gelatinolítica en tejidos pulmonares.

A pesar de no haberse observado cambios en la expresión génica de las gelatinasas A y B, decidimos realizar zimografía para detectar si había cambios en la actividad gelatinolítica, como previamente se había demostrado en otros modelos experimentales de inducción de daño pulmonar por hiperoxia (69, 72). Para este estudio se utilizaron $10\mu\text{g}$ de proteína de sobrenadantes de extractos de

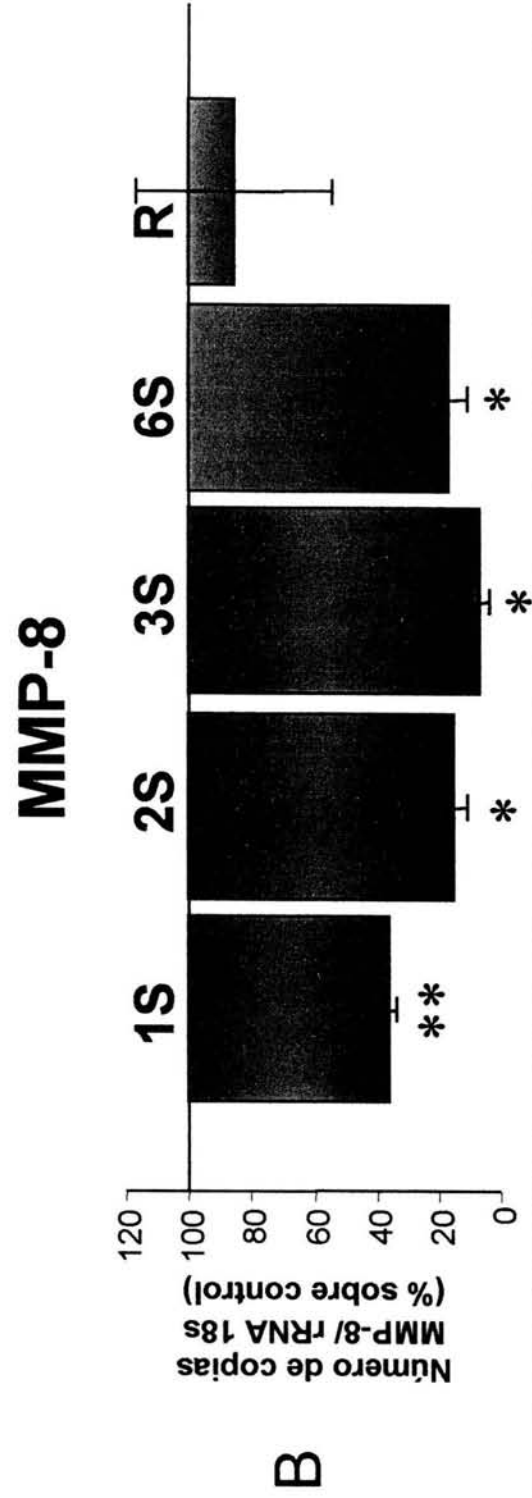
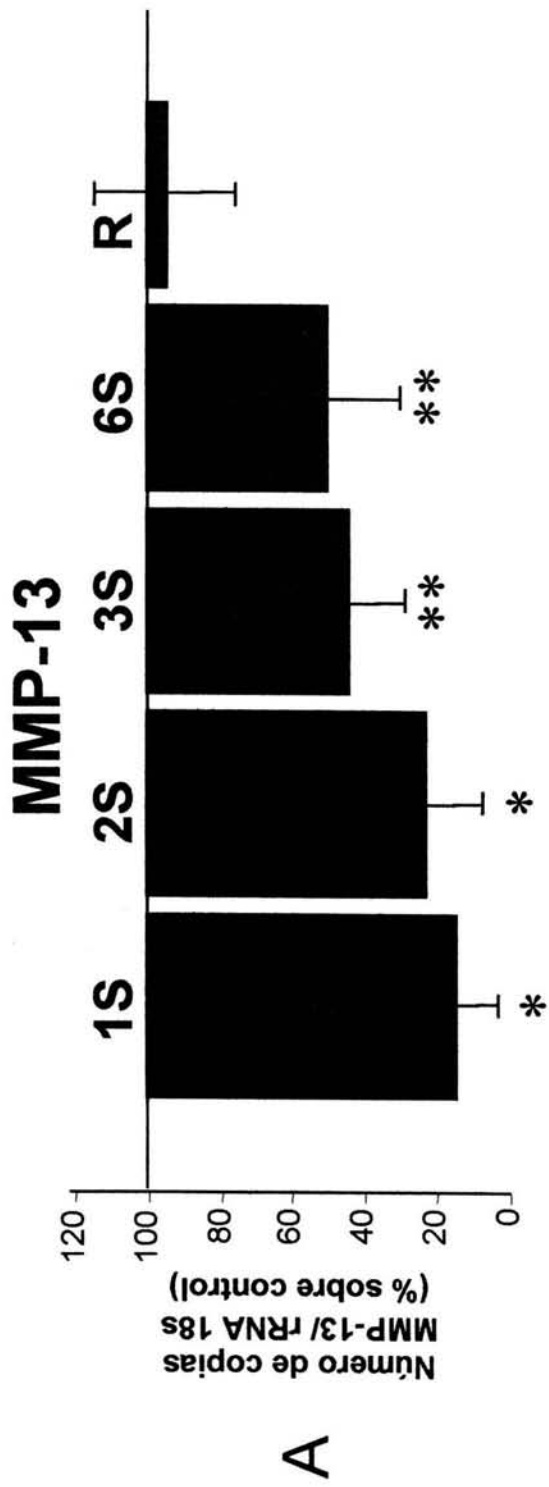


Figura 6: Cuantificación de la expresión génica para MMP-13 y MMP-8, por PCR en tiempo real. Expresión génica de MMP-13 (panel A) y de MMP-8 (panel B), normalizadas con el rRNA R18s de cada muestra. Los resultados se expresaron como porcentaje en relación al grupo control.* P< 0.01; ** P< 0.05.

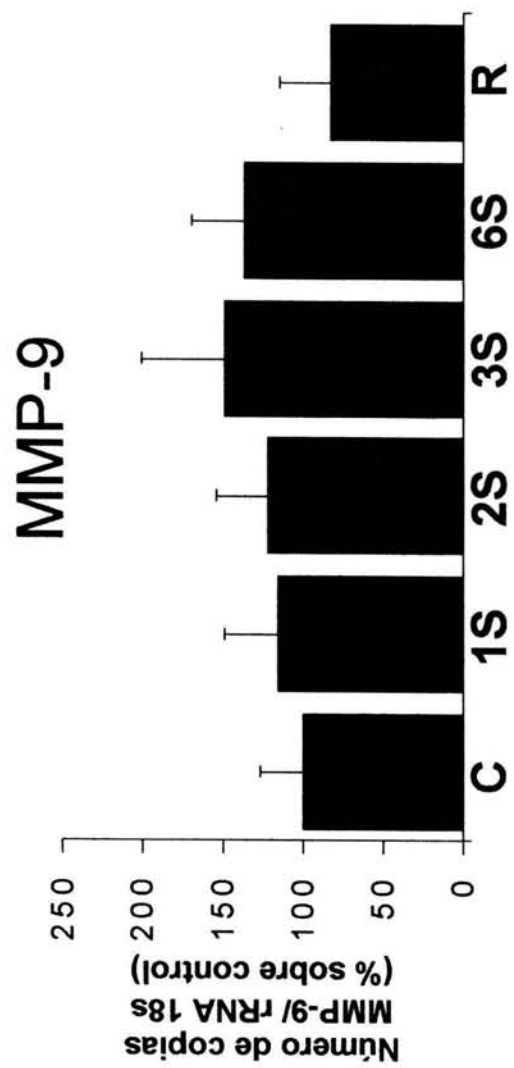
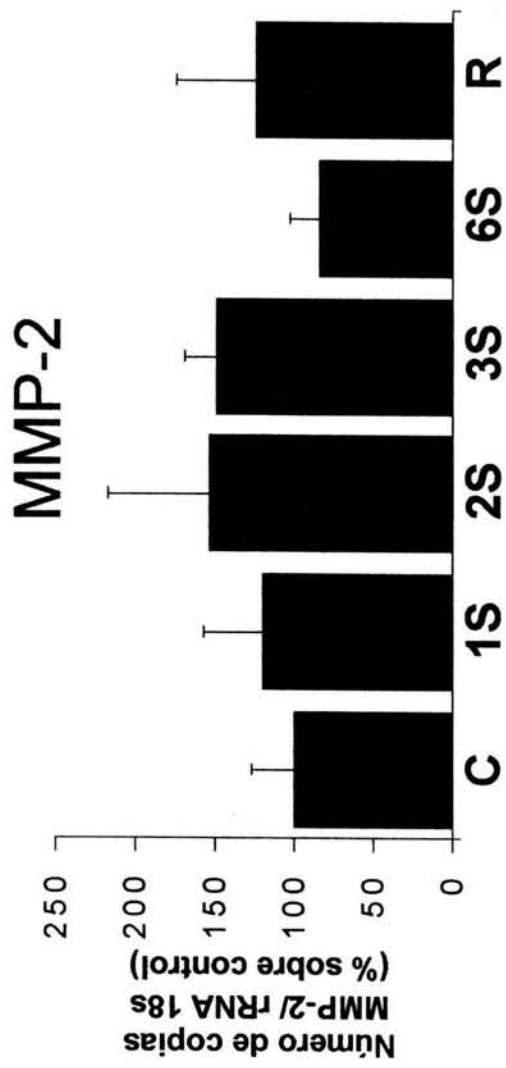
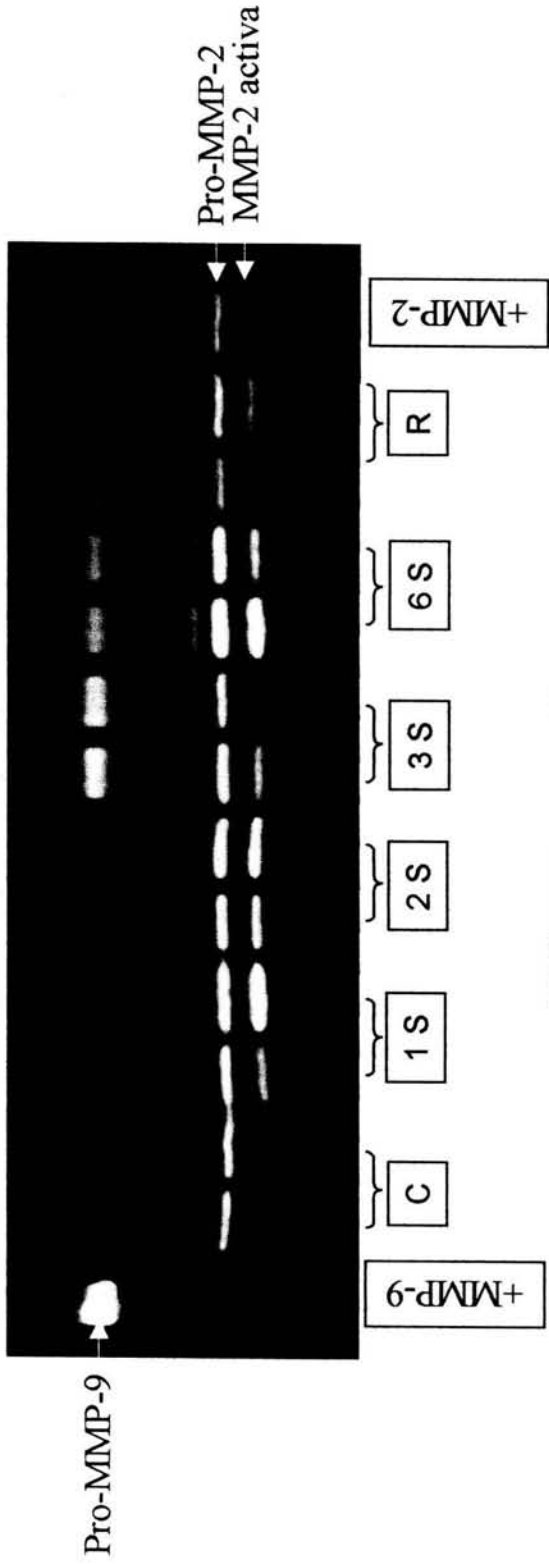


Figura 7: Cuantificación de la expresión génica para MMP-2 y MMP-9, por PCR en tiempo real.
 Expresión génica de MMP-2 (panel A) y de MMP-9 (panel B), normalizadas con el rRNA R18s de cada muestra. Los resultados se expresaron como porcentaje en relación al grupo control. No hubo diferencias significativas.

A



B

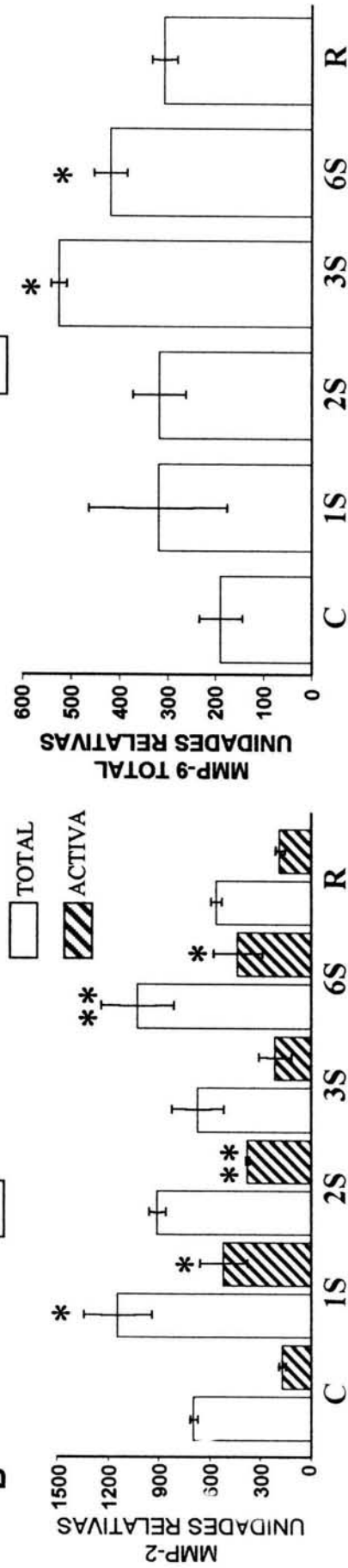


Figura 8: Zimografía de tejido pulmonar.

A: Muestras con ~ 10 µg de proteína se utilizaron para analizarlos por zimografía. C: ratas control; animales expuestos susceptibles de 1, 2, 3 y 6 semanas (1s, 2s, 3s y 6s respectivamente); y animales resistentes (R). Las zonas de actividad enzimática aparecen como bandas claras sobre un fondo oscuro. Como marcador positivo para MMP-2, se utilizó medio condicionado de fibroblastos humanos de pulmón (esquina superior derecha) y para MMP-9 se utilizó medio condicionado de células U2-OS estimuladas con PMA (esquina superior izquierda)

B: Gráfica comparativa de los análisis de intensidad neta de las bandas de lisis. (Ver resultados* P < 0.01; ** P < 0.05).

tejidos pulmonares. La figura 8A muestra un zimograma representativo que enseña dos muestras tisulares de cada periodo temporal. En esta figura se puede apreciar que, en relación con los animales control, los animales experimentales mostraron, desde la primera semana, un incremento en pro-MMP-2 y en especial de su forma activa, representada por una banda de menor peso molecular (62KDa). El análisis densitométrico de la superficie y la intensidad de las bandas de lisis, derivado del análisis de 5 diferentes animales en cada grupo determinó que este incremento es de alrededor de 2 a 3 veces (figura 8B gráfica inferior izquierda). Los animales resistentes se comportaron igual que los animales control.

Asimismo, se observó un incremento en la banda correspondiente a MMP-9, principalmente a las 3 y 6 semanas (figura 8B derecha). En esos periodos, la cuantificación densitométrica confirmó un incremento al doble comparado con los controles. Al igual que en los otros ensayos, los animales resistentes no mostraron diferencias estadísticamente significativas comparado con los controles.

Cuantificación de la expresión génica para los Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) por PCR en tiempo real.

Por PCR en tiempo real se observó un incremento significativo del RNAm del TIMP-1 desde la segunda semana hasta el final del experimento, con respecto al grupo control (figura 9A, $P < 0.05$ en la segunda semana y $P < 0.01$ a las tercera y sexta semana). Este incremento fue corroborado por Northern blot, aunque en este caso el incremento se apreció ocasionalmente desde la primera semana

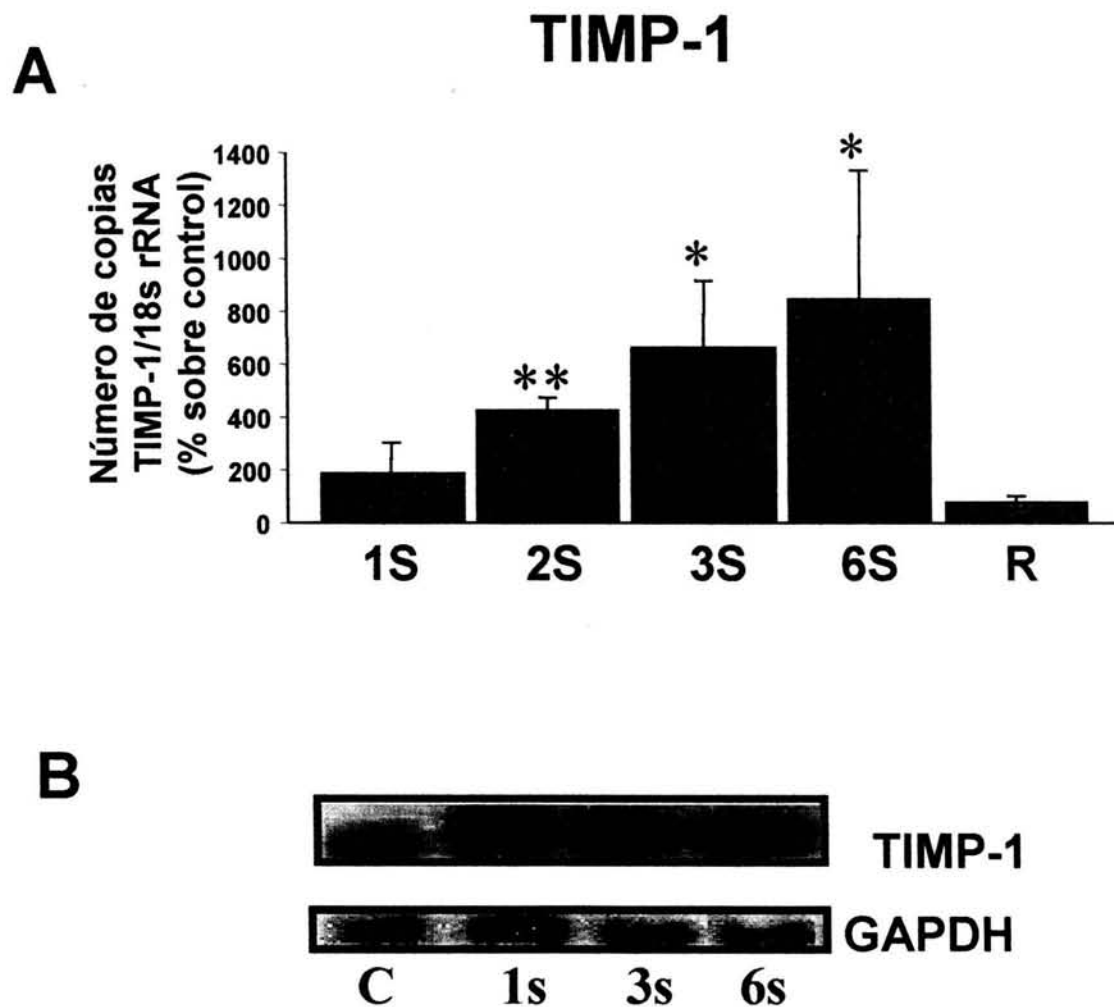


Figura : 9 Cuantificación de la expresión génica para TIMP-1.

A: PCR en tiempo real para TIMP1. Se observa un incremento en la expresión génica, la cual es significativa desde la segunda hasta la sexta semana de exposición. *P < 0.01; **P < 0.05.

B: Northern blot para TIMP-1. Se observa un incremento en la expresión génica desde la primera hasta la sexta semana de exposición; se tomó como control de niveles de expresión al gene constitutivo GAPDH.

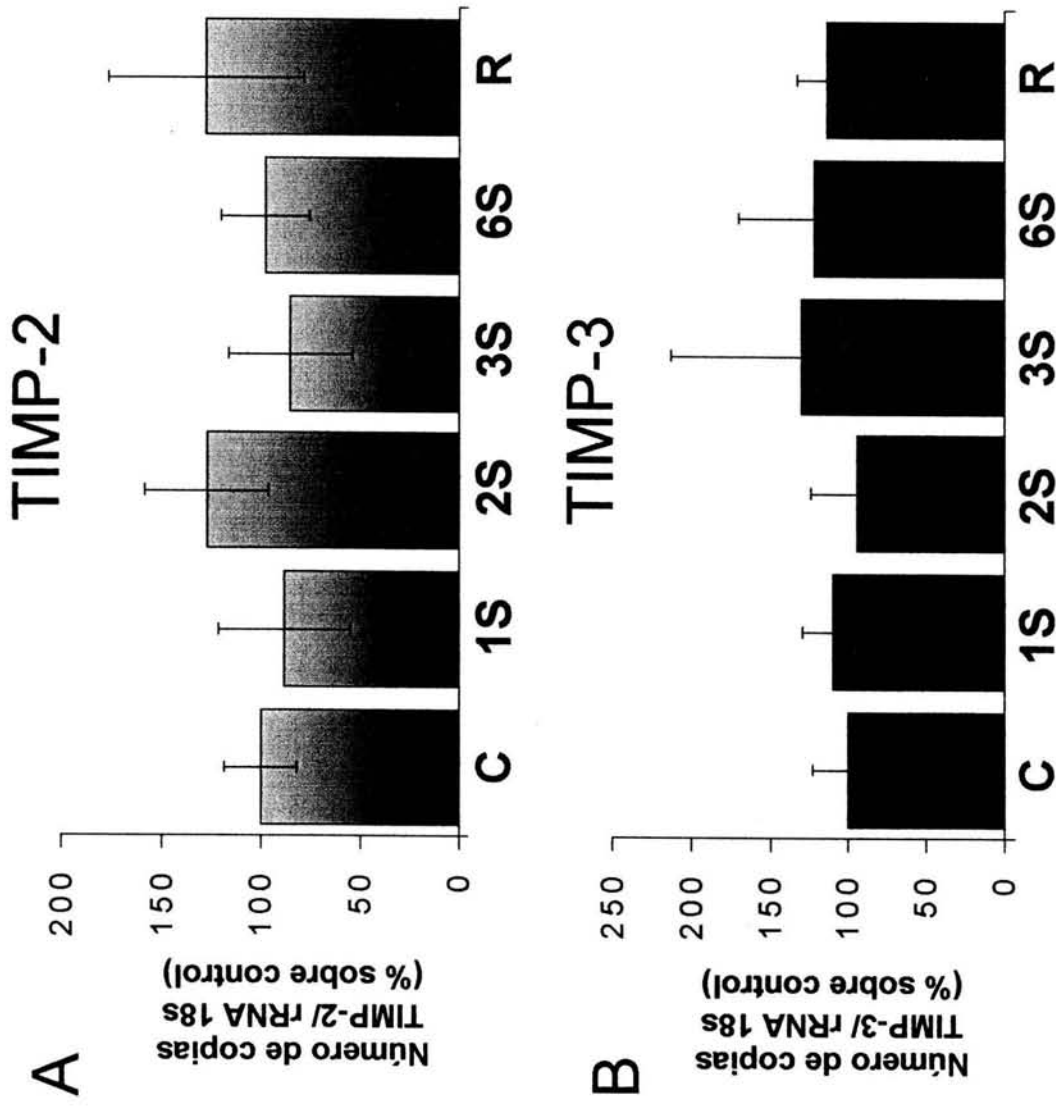


Figura 10: Cuantificación de la expresión génica para TIMP-2 y TIMP-3, por PCR en tiempo real.

Expresión génica de TIMP-2 (panel A) y de TIMP-3 (panel B), normalizadas con el rRNA R18s de cada muestra. Los resultados se expresaron como porcentaje en relación al grupo control. No hubo diferencias significativas.

como se ilustra en la figura 9B. Los animales resistentes no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles.

En contraste con el TIMP-1, los niveles de expresión de TIMP-2 y TIMP-3 no se modificaron (figura 10 A y B).

Localización de TIMP-1 por inmunohistoquímica

Con el objeto de analizar a nivel proteico la expresión de TIMP-1, este inhibidor fue analizado por inmunohistoquímica. Como puede observarse en la figura 11A, este inhibidor no fue detectado en pulmones normales. En contraste, los pulmones de ratas expuestas a paraquat e hiperoxia, mostraron la presencia de TIMP-1 desde la primera semana en adelante, principalmente en macrófagos alveolares (figura 11D) y ocasionalmente en células epiteliales alveolares y bronquiolares (figuras 11B y 11C). No se observaron diferencias en la localización de TIMP-1 con el progreso de las lesiones pulmonares, pero el inhibidor estuvo principalmente presente en áreas dañadas. Los controles negativos incubados con suero no inmune no presentaron ninguna señal (figura 11E).

Cuantificación de la expresión génica para los los factores de crecimiento y el péptido angiotensinógeno por PCR en tiempo real.

El único factor de crecimiento que se modificó durante el curso del experimento fue el TGF β 1. Este mediador se incrementó significativamente desde la primera hasta la tercera semana, regresando a los valores normales en la sexta semana. Por el contrario, en el grupo de los animales resistentes los niveles de

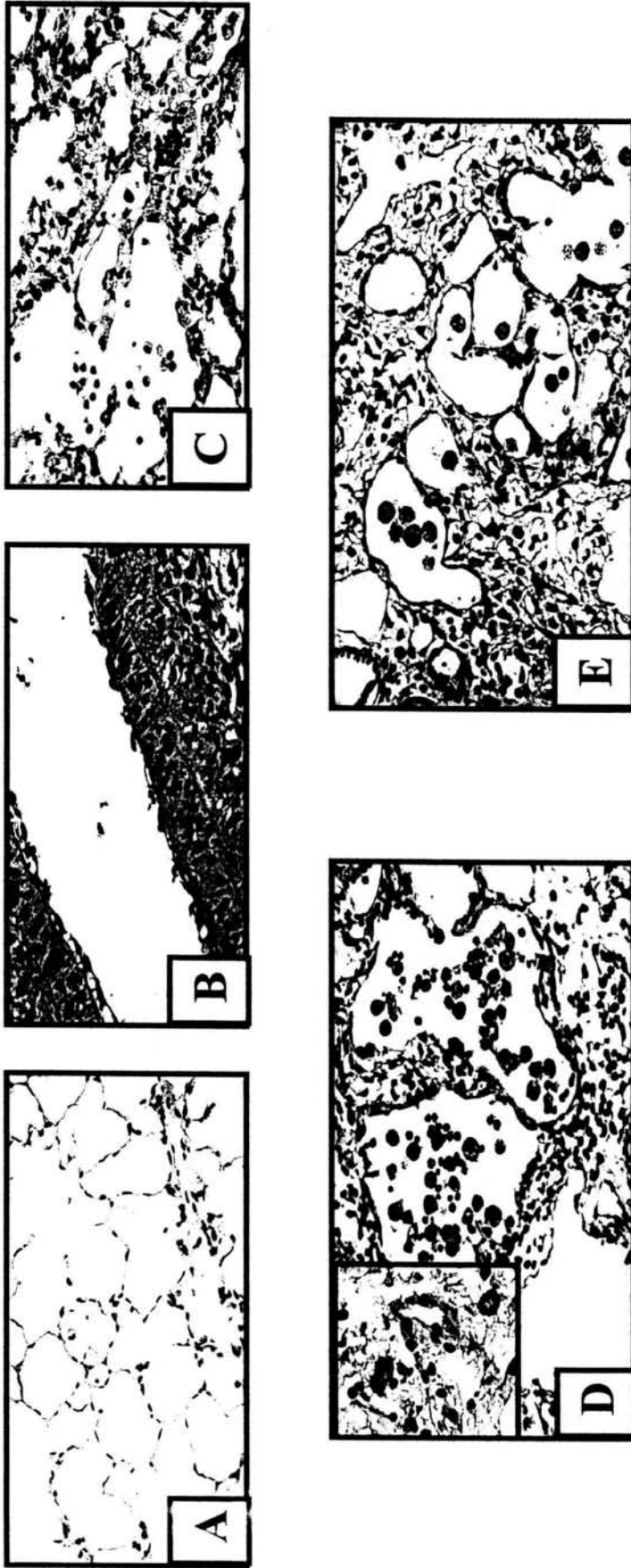


Figura 11: Inmunolocalización de TIMP-1 en pulmones experimentales y controles.
 Panel A: No se observó señal en los pulmones normales. Panel B: Después de dos semanas de exposición a paraquat e hiperoxia se observó TIMP-1 en células del epitelio bronquiolar. Panel C: Proteína inmunoreactiva en células del epitelio alveolar e inflamatorias. Panel D: Macrófagos alveolares positivos para TIMP-1. Se observan 2 macrófagos intensamente teñidos en el recuadro. Panel E: Control negativo, en el cual se omitió el anticuerpo primario.

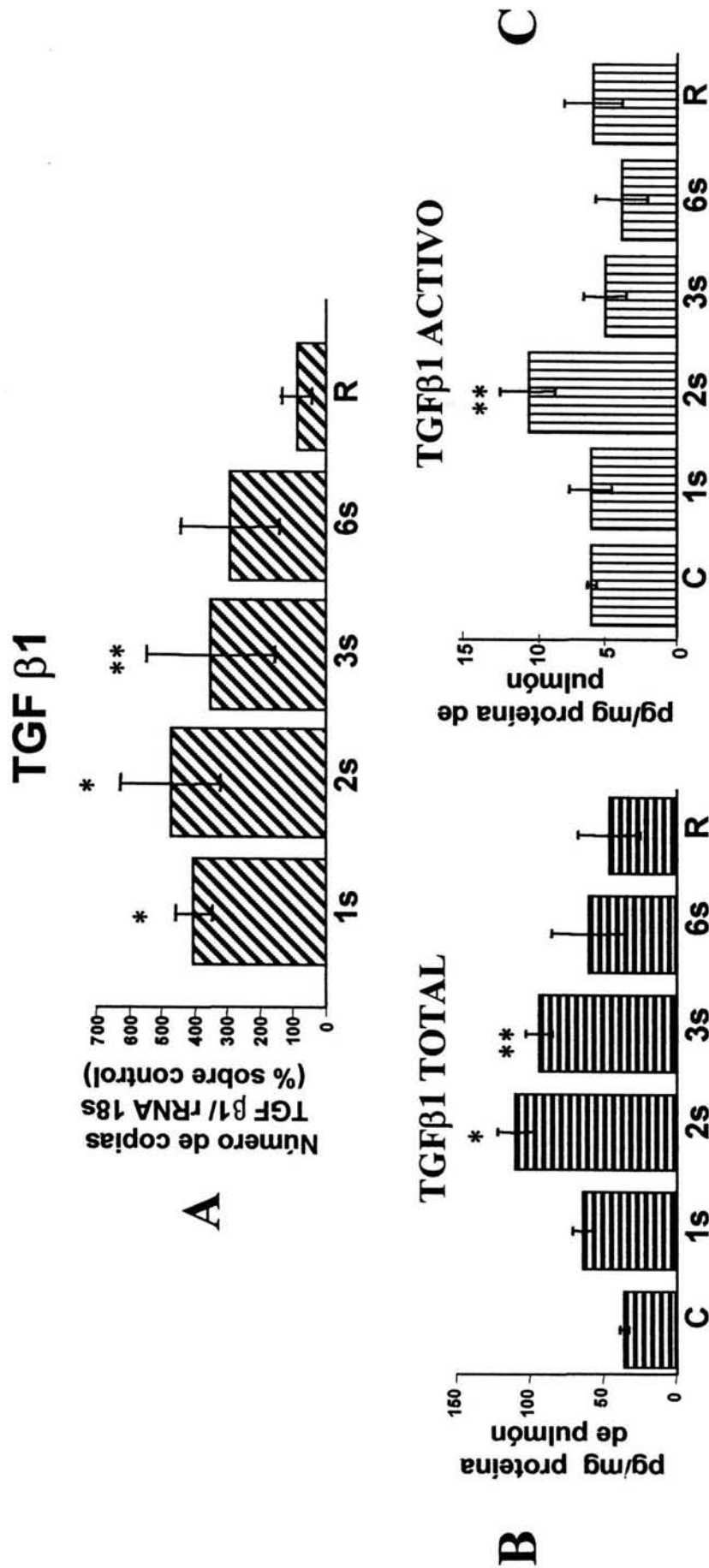


Figura 12:

A: Cuantificación de la expresión génica para TGFβ1, por PCR en tiempo real. Se observa un incremento en la expresión génica desde la primera hasta la tercera semanas de exposición. *P < 0.01; **P < 0.05.

B y C: Cuantificación de TGFβ1 medido por ELISA; TGFβ1 total (activo + latente) (B) y activado con HCl 1N (C); en homogenizados pulmonares. * P < 0.01; ** P < 0.05.

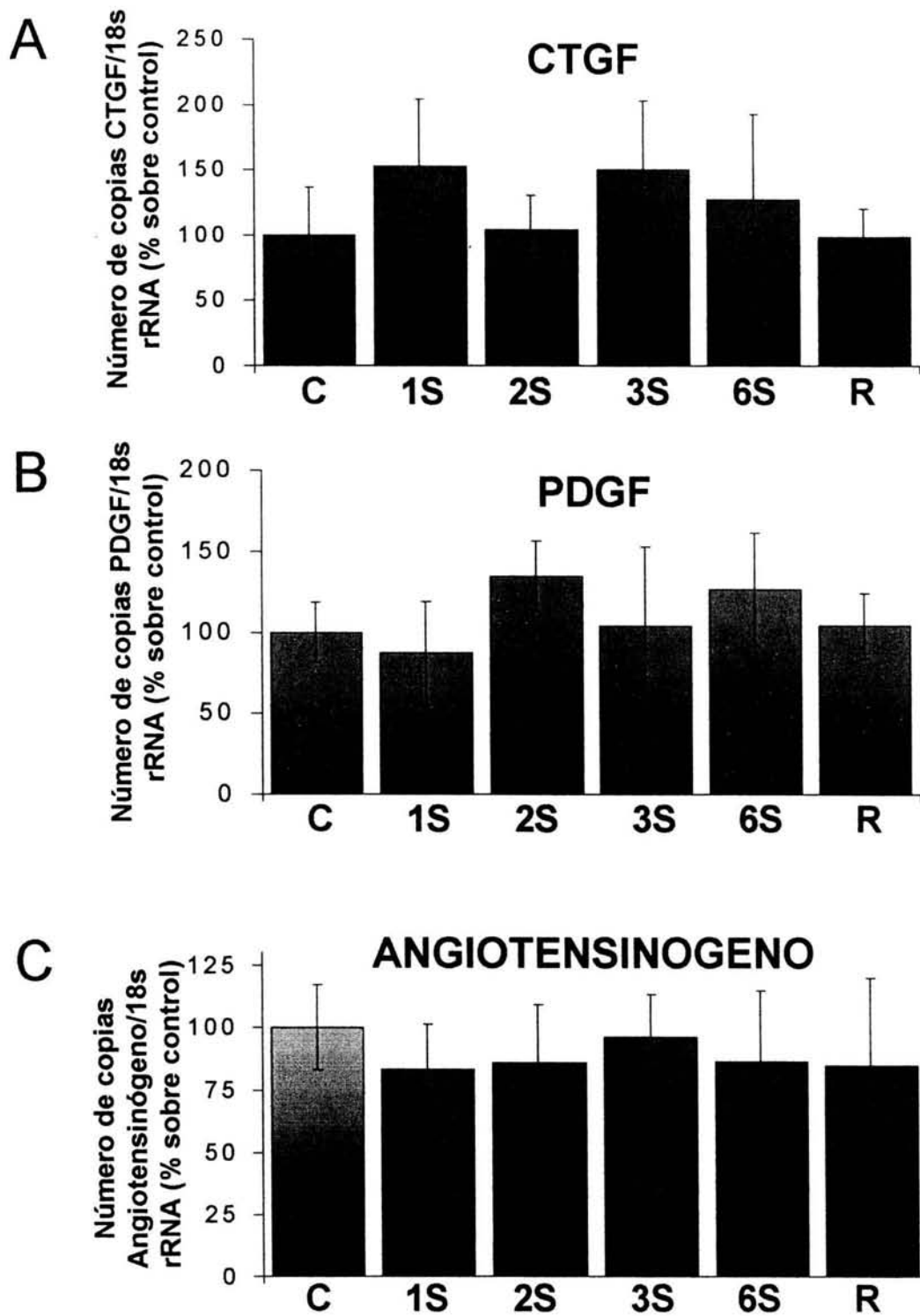


Figura 13: Cuantificación de la expresión génica para CTGF , PDGF y Angiotensinógeno , por PCR en tiempo real.

Expresión génica de CTGF (A), PDGF (B) y Angiotensinógeno (C), normalizadas con el rRNA R18s de cada muestra. Los resultados se expresaron como porcentaje en relación al grupo control. No hubo diferencias significativas.

expresión de este gen no mostraron cambios con respecto al grupo control. (figura 12A).

En relación a la expresión génica de PDGF-A, CTGF y angiotensinógeno, ésta no se vio modificada por las condiciones experimentales. (figuras 13 A, B y C).

Niveles pulmonares de TGF β 1 medidos por ELISA

Para corroborar el aumento de la expresión del gen de TGF β 1 a nivel proteico, la proteína se cuantificó por ELISA. El análisis del extracto proteico de los homogenados pulmonares mostró un incremento en los niveles de TGF β 1 total (activo más inactivo) a las 2 y 3 semanas de exposición a paraquat e hiperoxia ($p < 0.01$ y 0.05 , respectivamente); (figura 12B). La mayor parte de esta proteína se encontraba en forma latente (inactiva), la cual pudo ser medida después de su activación con ácido clorhídrico. La cantidad de proteína activa espontáneamente fue baja (5-10 ng/ml) y se encontró elevada solamente en los animales experimentales a las 2 semanas de exposición ($p < 0.05$; figura 12C). Los niveles de TGF β 1, en los animales resistentes no mostraron cambios con respecto al grupo control.

DISCUSIÓN

A pesar de múltiples estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo modelos animales y la enfermedad humana, los mecanismos patogénicos que operan en la fibrosis pulmonar no se conocen con precisión. Uno de los problemas más importantes es la escasez de modelos experimentales satisfactorios, que realmente se aproximen a lo que ocurre en el humano. El modelo más usado es el de lesión pulmonar inducido con bleomicina, pero este produce lesiones focales, peribronquiolares y/o subpleurales que en general no progresan (18).

Como hemos sugerido previamente (80, 81), un modelo experimental aceptable de fibrosis pulmonar intersticial difusa, debería reunir las siguientes características: 1) ser progresivo y potencialmente letal; 2) desarrollar datos clínicos y funcionales de insuficiencia respiratoria; y 3) representar las características histológicas de la enfermedad humana.

En este contexto, datos previos tanto morfológicos como bioquímicos, han demostrado que el modelo utilizado en este trabajo, el cual consiste en doble agresión pulmonar inducida con paraquat e hiperoxia, cumple adecuadamente esos criterios (80, 81). Un aporte adicional importante que se hizo en el presente estudio, fue la confirmación de la presencia de animales resistentes. Así, mientras los datos derivados de la observación clínica, el análisis histológico y la acumulación de colágena demostraron que la mayoría de los animales son susceptibles a esta doble agresión, otros animales sobrevivieron a 6 semanas del tratamiento con pocas o ninguna lesión pulmonar. Estas ratas resistentes,

obtuvieron ganancia en peso y no mostraron signos de insuficiencia respiratoria, a través del periodo de exposición.

En el presente estudio, analizamos un conjunto de variables morfológicas y moleculares, tanto en animales susceptibles como resistentes y controles, con el objeto de dilucidar algunos mecanismos que pudieran desempeñar un papel patogénico en la fibrogénesis pulmonar.

En términos generales, la fibrosis pulmonar difusa puede ser considerada como un proceso de reparación patológico que ocurre después de un daño, y que se caracteriza por fibroproliferación descontrolada y acumulación excesiva de matriz extracelular. Aunque los mecanismos moleculares involucrados en la extensa remodelación estructural que se observa en la respuesta fibrótica no se conocen bien, existen datos recientes que sugieren fuertemente, que la expresión y/o actividad anormal de las metaloproteinasas de matriz extracelular y sus inhibidores TIMPs desempeñan un papel importante (28, 69, 71, 72, 83). En este contexto, los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan esta hipótesis. Así, se observó una notable disminución en la expresión de las dos principales colagenasas presentes en las ratas en estado adulto junto con un incremento en la expresión de TIMP-1.

Las colagenasas de la rata son ortólogos equivalentes de la colagenasa de neutrófilos humana (MMP-8) y de la colagenasa 3 (MMP-13) y comparten la capacidad única de degradar a la hélice nativa de las colágenas fibrilares, que son las proteínas más abundantes en los tejidos fibróticos (10, 28). De hecho, la degradación de colágenas fibrilares en tejidos de rata y ratón ha sido atribuida fundamentalmente a la actividad de MMP-13, la principal colagenasa identificada

en estas especies. En humanos, esta metaloproteinasa de matriz fue identificada originalmente en carcinoma de mama (27) y está caracterizada por una potente actividad de degradación sobre un amplio espectro de proteínas de la matriz extracelular además de las colágenas fibrilares. Estudios recientes sugieren que MMP-13 desempeña un papel importante en la patogenia de la destrucción del tejido cartilaginoso en artritis reumatoide (73); sin embargo, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que esta enzima no se encuentra presente en tejido pulmonar humano normal o fibrótico (84).

La expresión del gen de MMP-13, ha sido previamente evaluada en fibrosis inducida por bleomicina en ratones, pero en contraste con los resultados obtenidos en este trabajo, no se observaron cambios en su expresión (91). En el presente estudio, se buscó también a la Mcol-A, el supuesto ortólogo de MMP-1 humano en murinos (11), pero su expresión génica se encontró sólo en embriones de ratas y no en los animales adultos ni en condiciones normales ni durante el desarrollo de fibrosis (datos no mostrados).

En relación a la MMP-8, enzima que degrada de manera preferencial a la colágena tipo I, es importante destacar que los estudios concernientes a su posible papel en el desarrollo fibrosis pulmonar son muy escasos. Nuestro hallazgo de una disminución de MMP-8 en este modelo experimental coincide con un estudio reciente en humanos donde se encontró que esta enzima es prácticamente inexistente en el parénquima respiratorio de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (84). De manera interesante, recientemente se ha sugerido que la sobre-expresión local de MMP-8 clonada en un vector adenoviral puede ayudar a revertir las lesiones fibróticas en cirrosis hepática experimental (29).

Adicionalmente encontramos que, en paralelo a la disminución de la expresión de las colagenasas y al desarrollo de la fibrosis pulmonar, hubo un incremento en la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas TIMP-1. De hecho, la expresión génica de este inhibidor estuvo consistentemente sobre-regulada en las ratas que progresaban a la fibrosis. Por inmunohistoquímica encontramos que TIMP-1 se expresó fundamentalmente en macrófagos alveolares, pero también en células del epitelio alveolar y estuvo espacialmente restringido a áreas de lesiones pulmonares. En este contexto, es importante enfatizar que TIMP-1 parece desempeñar un papel esencial en la fibrosis pulmonar en roedores. Este inhibidor, se encuentra notablemente sobre-regulado durante la fibrosis pulmonar experimental, y en particular parece estar selectiva y marcadamente incrementado en modelos murinos de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina (51, 91). En estos modelos se ha observado que altos niveles de TIMP-1 se presentan desde el inicio de la lesión inflamatoria y persisten por semanas (51). Asimismo, recientemente hemos encontrado que en ratones deficientes de los receptores de $TNF\alpha$, que muestran resistencia al desarrollo de fibrosis, la exposición a partículas de sílice no provoca cambios en TIMP1. En cambio, los ratones de la cepa silvestre (*wild type*) muestran un significativo incremento en este inhibidor con un desequilibrio en la relación TIMP-1/MMP-13 en paralelo con el desarrollo de fibrosis pulmonar (63).

En apoyo al importante papel que TIMP-1 parece tener en fibrosis pulmonar experimental, recientemente se demostró que una diferencia crucial entre una cepa de ratones resistente a la fibrosis y una susceptible después de la expresión

transitoria de TGF β 1, está asociada con la regulación de este inhibidor (42). Así la cepa de ratones C57BL/6, susceptible a la fibrosis, demostró una fuerte sobre-expresión del gen de TIMP-1 en sus pulmones *in vivo* y en sus fibroblastos *in vitro*, en contraste a una débil inducción en la cepa de ratones resistentes BALB/c, sugiriendo que las diferencias en la extensión de la fibrosis pulmonar, podrían ser en parte debidas a alteraciones en el metabolismo de la matriz extracelular provocado por la sobre-expresión de TIMP-1. Por otra parte, es importante señalar que TIMP-1, además de su papel como inhibidor de metaloproteinasas, participa en otros procesos como lo son proliferación y apoptosis; en particular, se ha publicado recientemente que TIMP-1 recombinante inhibe la apoptosis en células mesangiales de rata, inducida por ausencia de suero (48). En este sentido y aunque no se ha demostrado en fibrosis pulmonar, los datos en la literatura sugieren que TIMP-1 podría participar en la inhibición de la apoptosis de células mesenquimatosas como fibroblastos y miofibroblastos de tal manera que su sobre-expresión podría estar favoreciendo el desarrollo de la fibrosis por varios mecanismos.

En conjunto, estos hallazgos apoyan la hipótesis de que un desequilibrio entre el proceso de degradación de la matriz extracelular y la inhibición de la misma, participa activamente en el desarrollo de la fibrogénesis pulmonar y que la progresión hacia la fibrosis está asociada con la inhibición de la degradación de la matriz extracelular. En nuestro trabajo, la disminución de ambas colagenasas y el incremento en la expresión de TIMP-1 precedió a la acumulación de colágena en el parénquima pulmonar, sugiriendo que las proteínas de la matriz fibrilar están

depositándose en un micro-ambiente en el cual la degradación de la matriz se encuentra significativamente reducida; sin embargo, en este estudio no se evaluó la actividad colagenolítica. Es de particular interés señalar que en los animales resistentes no se apreciaron cambios en la expresión de colagenasas ni de TIMP-1 en comparación con las ratas control.

Los mecanismos que participan en la disminución de las colagenasas MMP-8 y MMP-13, así como en el incremento de TIMP-1 no se conocen con precisión, pero podrían estar al menos parcialmente relacionados con la producción del TGF β 1. Este mediador se considera un prototipo de factor pro-fibrosante y en nuestro estudio lo encontramos elevado tanto a nivel de mRNA como de proteína durante las tres primeras semanas de evolución del modelo. El efecto fibrogénico de TGF β 1 incluye varios niveles que implican la estimulación de la síntesis de moléculas de la matriz extracelular y una compleja regulación de la interacción de MMPs y TIMPs, incluyendo la estimulación de la expresión de TIMP-1 (35, 56, 79). En relación a las metaloproteinasas de matriz es importante enfatizar, que aunque TGF β 1 provoca un decremento en la expresión de MMP-1 y MMP-8, parece ser un potente inductor de la expresión de MMP-13, por lo menos *in vitro* (65, 97). Sin embargo, en estudios *in vivo*, usando ratones transgénicos que sobre-expresan TGF β 1, se ha sugerido un efecto de regulación negativa (79).

En relación a las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9) nuestros resultados fueron paradójicos. Así, mientras no se observaron cambios en su expresión génica, se apreció un importante incremento en su actividad. En el caso de la MMP-2 se relacionó principalmente con la forma activa y se observó desde el comienzo de la

doble agresión. Este resultado podría sugerir una sobre-regulación de la metaloproteinasa de matriz asociada a membrana MT1-MMP que participa en la activación de MMP-2. De manera similar, MMP-9 que no se incrementó a nivel de expresión génica, mostró un aumento en su actividad gelatinolítica como se mostró en los zimogramas. Este hallazgo puede ser atribuido, por lo menos parcialmente, al infiltrado leucocitario, ya que esas células almacenan y transportan en sus gránulos a enzimas de este tipo (69,106).

MMP-2 y MMP-9, tienen una amplia especificidad de sustratos, los cuales incluyen a la colágena tipo IV, el principal componente de las membranas basales; de esta manera, el incremento en sus actividades pueden contribuir a la destrucción de estas membranas. En este contexto, diferentes observaciones han sugerido que la integridad de la membrana basal epitelial desempeña un papel determinante en la reepitelización normal del pulmón evitando el desarrollo de fibrosis pulmonar (76). Asimismo, se ha observado ruptura de la membrana basal epitelial en fibrosis pulmonar idiopática humana y en modelos experimentales (71), y más recientemente se ha sugerido que este proceso patológico podría asociarse a una excesiva actividad de gelatinasas (84). Por ejemplo, en fibrosis pulmonar inducida con bleomicina, se ha encontrado una elevación significativa en la expresión y actividad de MMP-9 con la ruptura coincidente de la membrana basal del epitelio alveolar (108). En nuestro laboratorio, utilizando un ratón *knock-out* del gen gamma glutamil transpeptidasa, hemos encontrado que la susceptibilidad al desarrollo de fibrosis pulmonar intersticial difusa se acompaña, entre otros procesos, con un incremento en MMP-9 (70). De manera interesante, tanto MMP-2 como MMP-9 han sido encontradas elevadas en fibrosis pulmonar humana (28,

84). Por otro lado, es importante enfatizar que las gelatinasas A y B tienen, además de los componentes de matriz extracelular, otros sustratos no relacionados con la misma, que pueden potenciar la reacción fibrótica. Así por ejemplo, la MMP-9 localizada en la superficie celular, es capaz de activar proteolíticamente a TGF β 1 latente, proveyendo un mecanismo potencialmente importante para la activación de TGF β 1 y la remodelación tisular (108).

La pérdida del epitelio alveolar, supuestamente causada por apoptosis ha sido observada en fibrosis pulmonar humana y experimental y en este proceso, varios mecanismos parecen estar involucrados (26,34,36,99). En nuestro laboratorio hemos demostrado que fibroblastos de pulmón obtenidos de pacientes con fibrosis intersticial idiopática, inducen apoptosis de células del epitelio alveolar, lo que no se observa con fibroblastos derivados de pulmones normales (94). Esta actividad apoptótica parece relacionarse con la secreción de péptidos de angiotensina (99). Por otro lado, se ha encontrado que la vía de señalización de Fas se encuentra sobre-regulada en células epiteliales derivadas de fibrosis pulmonar humana y experimental (34,55). Aún más, se ha demostrado que una sola instilación de bleomicina provoca apoptosis en células del epitelio alveolar y bronquiolar la cual parece asociarse con la progresión de la fibrosis (33).

En nuestro estudio, observamos la presencia de muerte celular por apoptosis del epitelio alveolar y bronquiolar desde la primera semana de exposición a paraquat e hiperoxia hasta el final del experimento, sugiriendo que también puede estar involucrada en el desarrollo de fibrosis pulmonar en este modelo, alterando la re-epitelización normal del tejido dañado. Es importante señalar, que la mayoría de

las células epiteliales fuertemente positivas para el marcaje de DNA fragmentado se encontraban dentro de las áreas lesionadas, y que este proceso fue menos intenso en las regiones normales del parénquima, lo cual es consistente con el papel que puede desempeñar la apoptosis en determinar la tasa de reparación epitelial (96). Al igual como se observó con las moléculas evaluadas, las ratas resistentes se comportaron en general como los controles y presentaron escasas células epiteliales apoptóticas.

También observamos durante todo el curso del experimento marcaje de DNA fragmentado en células inflamatorias intra-alveolares e intersticiales lo que puede estar señalando un proceso de eliminación de estas células por apoptosis. Además, las células apoptóticas intersticiales podrían corresponder a fibroblastos involucrados en el proceso de remodelación.

En resumen, en este trabajo se encontró una fuerte correlación entre la disminución de la expresión génica de las colagenasas intersticiales y el incremento de la expresión génica de TIMP-1 y TGF β 1 con el desarrollo de fibrosis intersticial difusa. Asimismo, el incremento en la actividad gelatinolítica y la apoptosis epitelial fueron importantes características que precedieron y acompañaron a la respuesta fibrótica en este modelo. Estos hallazgos sugieren que la remodelación inadecuada de la matriz extracelular contribuye de manera importante a la fibrosis inducida con paraquat e hiperoxia. Las bases de las diferencias en susceptibilidad entre los animales expuestos a esta doble agresión es desconocida hasta ahora, pero constituyen un tópico de interés para trabajos futuros.

CONCLUSIONES

1.- La exposición a paraquat e hiperoxia provoca graves lesiones en el parénquima pulmonar que evolucionan hacia la fibrosis.

2.- Durante la evolución del modelo y el desarrollo de la fibrosis se observó una disminución en la expresión de las dos metaloproteinasas de matriz encargadas de la degradación de las colágenas fibrilares, MMP-8 y MMP-13.

3.- Se apreció desde tiempos tempranos un incremento en la expresión del inhibidor TIMP-1, el cual era sintetizado principalmente por macrófagos alveolares y ocasionalmente por células del epitelio alveolar y bronquial.

4.- En las primeras semanas de evolución del modelo, se observó un incremento en la expresión a nivel de gen y proteína del TGF β 1.

5.- Durante toda la evolución del modelo, se encontró un incremento en la actividad gelatinolítica atribuible a MMP-2 y MMP-9.

6.- Durante toda la evolución del modelo se observaron numerosas células apoptóticas; éstas fueron principalmente células epiteliales alveolares y bronquiolares y estuvieron distribuidas difusamente en el parénquima pulmonar. También se observaron núcleos apoptóticos en células inflamatorias, y presumiblemente en fibroblastos intersticiales.

BIBLIOGRAFIA

1. **Adamson IYR, Young L, and Bowden DH.** Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 130:377-383, 1988.
2. **Ahonen M, Poukkula M, Baker AH, Kashiwagi M, Nagase H, Eriksson JE and Kahari VM.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogen* 22(14):2121-34, 2003.
3. **Allen T.J, C.A. Bloor, R.A. Knight & M.A. Spiteri:** Expression of insulin-like growth factor binding proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 99, 250-258, 1998
4. **Amour, A, Slocombe, PM, Webster, A, Butler, M, Knigh, CG, Smith, BJ, Stephens, P.E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., Docherty, A.J. and Murphy, G.** TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* 435:39-44, 1998.
5. **Andreutti D, G. Gabbiani, & P. Neville:** Early granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression by alveolar inflammatory cells during bleomycin-induced rat lung fibrosis. *Lab Invest* 78, 1493-502, 1998
6. **Antoniades NH, Bravo M, Avila R, Galanopoulos T, Neville J, and Selman M.** Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 86:1055-1064, 1990.
7. **Aumailley, M. and Gayraud, B.** Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol. Med.* 76:253-265, 1998.

8. **Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, and Newby AC.** Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* 101:1478-1487, 1998.
9. **Baker HJ, Lindsey JR, and Weisbroth SH.** The Laboratory Rat. Vol I, Biology and Diseases. American College of Laboratory; Animal Medicine Series, Academic Press, New York, 1979.
10. **Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Lopez JM, Alvarez J, Sanchez LM, Quesada V, Bordallo J, Murphy G, and Lopez-Otin C.** Collagenase 2 (MMP-8) Expression in Murine Tissue-remodeling Processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem* 273: 23959-23966, 1998.
11. **Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Lopez JM, Alvarez J, Sanchez LM, Quesada V, Bordallo J, Murphy G, and Lopez-Otin C.** Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem* 276:10253-10262, 2001.
12. **Barnard, J.W., Womack, W.A., Smith, S.M., Engerson, T.D. and Taylor, A.E.** Lung protection against paraquat is calcium dependent. *J. Appl. Physiol.* 72(2):498-504, 1992.
13. **Barrios R, Pardo A, Ramos C, Montaña M, Ramírez R, and Selman M.** Upregulation of acidic fibroblast growth factor during development of experimental lung fibrosis. *Am J Physiol* 273:L451-L458, 1997.
14. **Becerril C, Pardo A, Montaña M, Ramos C, Ramírez R, and Selman M.**

Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Molec Biol* 20:1020-1027, 1999.

15. **Bloor C.A, R.A. Knight, R.K. Kedia, M.A. Spiteri & J.T. Allen:** Differential mRNA expression of insulin-like growth factor-1 splice variants in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 265-272 (2001)

16. **Bode, W. and Maskos, C.** Structural basis of matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol. Chem.* 384:863-872, 2003.

17. **Bonner J.C, P.M. Lindroos, A.B. Rice, C.R. Moomaw & D.L. Morgan:** Induction of PDGF receptor-alpha in rat myofibroblasts during pulmonary fibrogenesis *in vivo*. *Am J Physiol* 274, L72-L80, 1998

18. **Borzzone G, Moreno R, Urrea R, Meneses M, Oyarzun M, Lisboa C.** Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:1648-1653, 2001).

19. **Boström,H., Willetts, K., Pekny, M., Levéen, P., Lindahl, P., Hedstrand, H.,Pekna, N. and Hellström, M.** PDGF-A signaling is critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*, 85:863-873, 1996.

20. **Castoldi G, Di Gioia CR, Pieruzzi F, D' Orlando C, Van De Greef W, Busca G, Sperti G, and Stella A.** Angiotensin II increases tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) expression in rat aortic smooth muscle cells *in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H635-643, 2003.

21. **Chetty A, S. Faber & H.C. Nielsen:** Epithelial-mesenchymal interaction and insulin-like growth factors in hyperoxic lung injury. *Exp Lung Res* 25, 701-718,

1999.

22. **Coultas, D.B., Zumwalt, R.E., and Black; W.C.** The epidemiology of interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:967-972, 1994.

23. **Desmouliere A, A. Geinoz, F. Gabiani, & G. Gabbiani:** Transforming growth factor- β 1 induces a smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122, 103-11, 1993.

24. **Dobrian A, Wade S, and Prewitt R.** PDGF-A expression correlates with blood pressure and remodeling in 1K1C hypertensive rat arteries. *Am J Physiol* 276: H2159- H2167, 1999.

25. **Fata JE, Leco KJ, Voura EB, Yu HY, Waterhouse P, Murphy G, Moorehead RA, Khokha R.** Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland. *J Clin. Invest.* 108(6):831-41, 2001.

26. **Fine A, Anderson N, Rothstein T, Williams M, and Gochuico B.** FAS expression in pulmonary alveolar type II cells. *Am J Physiol* 273:L64-L71, 1997.

27. **Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, and Lopez-Otin C.** Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269:16766-16773, 1994.

28. **Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, and Yamanaka N.** Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 78:687-698, 1998.

29. **Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, and Armendariz-Borunda J.** Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 9:127-134, 2002.
30. **Gennynne, A., Walker, I., Guerrero, A. and Leinwand, L.A.** Myofibroblast: Molecular crossdressers. *Curr. Top. Dev. Biol.* 51:91-107, 2001.
31. **Gómez D, Alonso D, Yoshiji U, and Thorgeirsson P.** Tissue Inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111- 122, 1997.
32. **Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang L, Fukushima P, Mansoor A, and Stetler-Stevenson M.** In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 102:2002-2010, 1998.
33. **Hagimoto N, Kuwano K, Nomoto Y, Kunitake R, and Hara N.** Apoptosis and expression of FAS/FAS ligand mRNA in bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:91-101, 1997.
34. **Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, Kanika Y, and Hara N.** Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of FAS antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:272-278, 1997.
35. **Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, and Clark IM.** The Comparative Role of Activator Protein 1 and Smad Factors in the Regulation of Timp-1 and MMP-1 Gene Expression by Transforming Growth Factor-beta 1. *J Biol Chem* 278:10304-10313, 2003.

36. **Harrison N.K, A.D. Cambrey, A.R. Myers, A.M. Southcott, C.M. Black, R.M. DuBois, G.J. Laurent & R.J. McAnulty:** Insulin-like growth factor-1 is partially responsible for fibroblast proliferation induced by bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis. *Clin Sci* 86, 141-148, 1994.
37. **Haschek WM, Reiser KM, Klein-Szanto AJP, Last JA, and Witschi HP.** Potentiation of butylated hydroxytoluene induced lung damage by oxygen: cell kinetics and collagen metabolism. *Am Rev Resp Dis* 127:28-34, 1983.
38. **Henry MT, McMahon K, Mackarel AJ, Prikk K, Sorsa T, Maisi P, Sepper R, Fitzgerald MX, and O'Connor CM.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF. *Eur Respir J* 20:1220-1227, 2002.
39. **Hirasawa Y, N. Kohno, A. Yokoyama, Y. Inoue, M. Abe & K. Hiwada:** KL-6, a human MUC1 mucin, is chemotactic for human fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 501-507, 1997.
40. **Hironobu, I.** Pathogenesis of fibrosis: role of TGF β and CTGF. *Curr. Opin. Rheumatol.* 14:681-685, 2002.
41. **Horowitz, S.** Pathways to cell death in hyperoxia. *Chest.*, 116:64S-67S, 1999.
42. **Kolb M, Bonniaud P, Galt T, Sime PJ, Kelly MM, Margetts PJ, and Gauldie J.** Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor-beta1 gene to lungs of "fibrosis-prone" and "fibrosis-resistant" mouse strains. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:141-150, 2002.
- 43 **Lambert E, Boudot C, Kadri Z, Soula-Rothhut M, Sowa ML, Mayeux P, Hornebeck W, Haye B, Petitfrere E.**Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signaling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem. J.* 372(Pt 3):767-74,

2003.

44. **Lasky, J.A., Ortiz, L.A., Tonthat, B., Hoyle, G.W., Corti, M., Athas, G., Lungarella, G., Brody, A. and Fridman, M.** Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Physiol.* 275:L365-L371.
45. **Leivonen SK, Chantry A, Hakkinen L, Han J, and Kahari VM.** Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. *J Biol Chem* 277:46338-46346, 2002.
46. **Li H, Lindenmeyer F, Grenet C, Opolon P, Menashi S, Soria C, Yeh P. and Perricaudet.** AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice. *Hum Gene Ther.* 12(5):515-26, 2001.
47. **Lim MS, Guedez L, Stetler-Stevenson WG and Stetler-Stevenson M.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 induces apoptosis in human T lymphocytes. *Ann NY Acad Sci.* 878:522-3,1999.
48. **Lin H, Chen X and Wang J, Yu Z.** Inhibition of apoptosis in rat mesangial cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Kidney Int.* 62(1):60-9, 2002.
49. **Liu JY, Morris GF, Lei WH, Hart CE, Lasky JA, and Brody AR.** Rapid activation of PDGF-A and -B expression at sites of lung injury in asbestos-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:129-140, 1997.
50. **Liu XW, Bernardo MM, Fridman R and Kim HR.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the FAK/PI 3-kinase and MAPK signaling pathway.

J Biol Chem. Aug 5 [Epub ahead of print], 2003.

51. **Madtes DK, Elston AL, Kaback LA, and Clark JG.** Selective induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:599-607, 2001.

52. **Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Matsuba T, Yoshimi M, Inoshima I, Yoshida K, and Hara N.** Upregulation of Fas-signalling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 17:180-189, 2001.

53. **Marshall RP, McAnulty RJ, Laurent GJ.** Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type 1 receptor. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1999-2004, 2000.

54. **Martin P.: Wound healing--aiming for perfect skin regeneration.** *Science* 276, 75-81, 1997.

55. **Martin T.R., Nakamura M., and Matute-Bello G.** The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit. Care. Med.* 31(4 Suppl.) S184-S187.

56. **McAnulty RJ, Campa JS, Cambrey AD, and Laurent GJ.** The effect of transforming growth factor β on rates of procollagen synthesis and degradation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1091:231-235, 1991.

57. **McCawley LJ, and Matrisian LM.** Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Curr Op Cell Biol* 13:534-540, 2001.

58. **Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, and Iredale JP.** Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix

metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 277:11069-11076, 2002.

59. **Nagase H., and Woessner JF.** Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491- 21494, 1999.

60. **Nguyen L, Ward WF, Ts'ao CH, Molteni A.** Captopril inhibits proliferation of human lung fibroblasts in culture: a potential antifibrotic mechanism. *Proc Soc Exp Biol Med* 205:80-84, 1994.

61. **Nanneke, A.A., Van Der Wal, Lewis, L.S., Johannes F.L., Oirschot, M.V. and Asbeck S.V.** Effect of iron chelators on paraquat toxicity in rats and alveolar type II cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:180-186, 1992.

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

63. **Ortiz LA, Lasky J, Gozal E, Ruiz V, Lungarella G, Cavarra E, Brody AR, Friedman M, Pardo A, Selman M.** Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis. *Am J respir Crit Care Med*, 2001; 163(1): 244-252.

64. **Pakbaz, H., Hussein, D.F., Hassan I.B., Margit, T. and Said S.I.** Paraquat-induced lung injury: prevention by vasoactive intestinal peptide and related peptide helodermin. *Am. J. Physiol.* 265:L369-L373, 1993.

65. **Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Ronka H, Sorsa T, Salo T, and Tjaderhane L.** The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *J Dent Res* 79:77-84, 2000

66. **Pan, L.H., Yamauch, K., Uzuki, M., Nakanishi, T., Takigawa, M., Inoue, H. and Sawai, T.** Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblast express connective tissue growth factor in IPF. *Eur. Respir. J.* 17:1220-1227, 2001.
67. **Pappo, S. Bonini, F.X. Maquart, L. Aloe, & F. Levi-Schaffer:** Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6162-6167, 2001.
68. **Pardo A, Selman M, Ridge K, Barrios R, and Sznajder JI.** Increased expression of gelatinases and collagenase in rat lungs exposed to 100% oxygen. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1067-1075, 1996.
69. **Pardo A, Barrios R, Maldonado V, Meléndez J, Ruiz V, Segura L, Sznajder JI, and Selman M.** Gelatinases A and B are upregulated in lung rats by subacute hyperoxia. Pathogenetic implications. *Am J Pathol* 153:833-844, 1998.
70. **Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Ramirez R, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Barrios R, Kala SV, Lieberman MW, Selman M.** Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyltranspeptidase-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Mar 15;167(6):925-32. 2002.
71. **Pardo A, and Selman M.** Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Bioscience* 7, d1743-1761, August 1, 2002.
72. **Pérez-Ramos J, Segura L, Ramírez R, Vanda B, Selman M, and Pardo A.** Matriz metalloproteinases 2, 9, and 13 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in early and late lesions of experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1274-1282, 1999.
73. **Petrow PK, Wernicke D, Schulze Westhoff C, Hummel KM, Brauer R.**

Kriegsmann J, Gromnica-Ihle E, Gay RE, and Gay S. Characterisation of the cell type-specificity of collagenase 3 mRNA expression in comparison with membrane type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 61:391-397, 2002.

74. **Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J. D., Crowe S. E., Saada, J.I. and West A.B.** Myofibroblast. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol.* 277(46): C1-C19, 1999.

75. **Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, and Kang AH.** Transforming growth factor- β increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 79:1285-1288, 1987.

76. **Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, and Striker GE.** Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 131:281-289, 1985.

77. **Sasaki M, M. Kashima, T. Ito, A. Watanabe, N. Izumiyama, M. Sano, M. Kagaya, T. Shioya & M. Miura:** Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha. *Mediators Inflamm* 9, 155-160, 2000.

78. **Schmittgen TD, and Zakrajsek BA.** Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem Biophys Methods* 46:69-81, 2000.

79. **Seeland U, Haeuseler C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfitzner T, Scharffetter-Kochanek K, and Bohm M.** Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur J Clin Invest* 32:295-303, 2002.

80. **Selman M, Montano M, Montfort I, and Perez-Tamayo R.** A new model of diffuse interstitial pulmonary fibrosis in the rat. *Exp Mol Pathol* 43:375-387, 1985.
81. **Selman M, Montano 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 Molec Pathol* 50:147-166, 1989.
82. **Selman, M.** Neumopatías intersticiales difusas. *México, D.F. Ed., Panamericana, 1997: 89-98.*
83. **Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, and Pardo A.** TIMP -1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? *Am J Physiol* 279:L562-L574, 2000.
84. **Selman M, King TE, and Pardo A.** Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134:136-151, 2001.
85. **Sheehan, H.** Theory practice of histotechnology. *St. Louis, Mo. Mosby, 1973: 143-146.*
86. **Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, and Andoh TF.** Angiotensin II blockade decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 52:660- 673, 1997.
87. **Sime P.J, Z. Xing, F.L. Graham, K.G. Csaky, & J. Gauldie:** Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 100, 768-76, 1997.
88. **Simpsson DA.** Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Molecular Vision* 6:178-

183, 2000.

89. **Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A. and Goldberg, G.I.** Mechanism of cell surface activation of 72 kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 270:5331-5338, 1995.
90. **Suganuma H, A. Sato, R. Tamura & K. Chida:** Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions. *Thorax* 50, 984-989, 1995.
91. **Swiderski RE, Dencoff JE, Floerchinger CS, Shapiro SD, and Hunninghake GW.** Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 152:821-828, 1998.
92. **Tabibzadeh S.** Homeostasis of extracellular matrix by TGF-beta and lefty. *Front Biosciences* 7:d1231-246, 2002.
93. **Tummalapalli CM, Heath BJ, Tyagi SC.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 2001;80(4):512-21.
94. **Uhal BD, Joshi I, True A, Mundle S, Raza A, Pardo A, and Selman M.** Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 269:L819-L828, 1995.
95. **Uhal BD.** Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium (Invited Review). *Am J Physiol* 272:L1031-L1045, 1997.
96. **Uhal BD, Joshi I, Hughes W, Ramos C, Pardo A, and Selman M.** Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol* 275:L1192-L1199, 1998.

97. **Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JM, and Lopez-Otin C.** Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 273:9769-9777, 1998.
98. **Von Schnakenburg C, Strehlau J, Ehrich JH, and Melk A.** Quantitative gene expression of TGF-beta1, IL-10, TNF-alpha and Fas Ligand in renal cortex and medulla. *Nephrol Dial Transplant* 17:573-579, 2002.
99. **Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, and Uhal B.** Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol* 277:L1158-L1164, 1999.
100. **Wallace JA, Alexander S, Estrada EY, Hines C, Cunningham LA and Rosenberg GA.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is associated with neuronal death in reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22(11):1303-10, 2002.
101. **Wells GM, Catlin G, Cossins JA, Mangan M, Ward GA, Miller KM, and Clements JM.** Quantitation of matrix metalloproteinases in cultured rat astrocytes using the polymerase chain reaction with a multi-competitor cDNA standard. *Glia* 18:332-340, 1996.
102. **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.
103. **Woessner JF, and Nagase H.** Matrix metalloproteinases and TIMPs, *New York: Oxford University Press, 2000.*
104. **Xiaopeng L., Zhang H., Soledad-Conrad V., Zhuang J. and Uhal B.D.** Bleomycin-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires angiotensin synthesis de novo. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284:L501-L507.

105. **Xing Z, G.M. Tremblay, P.J. Sime, & J. Gauldie.** Overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces pulmonary granulation tissue formation and fibrosis by induction of transforming growth factor-beta 1 and myofibroblast accumulation. *Am J Pathol* 150:59-66, 1997.
106. **Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizaki M, and Yamanaka N.** Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pathol Int* 48:954-963, 1998.
107. **Yu J, A. Moon & H.R. Kim:** Both platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha and PDGFR-beta promote murine fibroblast cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 697-700, 2001.
108. **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.
109. **Yue G., Russell, W.J., Benos, D. J., Jackson, R.M., Olman, M.A. and Matalon S.** Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells of hyperoxic rats. *Proct. Natl. Acad. Sci.* 92:8418-8422, 1995.
110. **Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH.** Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 145:114-125, 1994.

Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis

Victor Ruiz,¹ Rosa Ma. Ordóñez,² Jaime Berumen,² Remedios Ramírez,³
Bruce Uhal,⁴ Carina Becerril,¹ Annie Pardo,³ and Moisés Selman¹

¹Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, CP14080, ²Hospital General de Mexico, SSA, Mexico City, CP06720, and ³Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Mexico City, CP04510, Mexico; and ⁴Department of Physiology, Michigan State University, Lansing, Michigan 48824

Submitted 9 June 2003; accepted in final form 20 July 2003

Ruiz, Victor, Rosa Ma. Ordóñez, Jaime Berumen, Remedios Ramírez, Bruce Uhal, Carina Becerril, Annie Pardo, and Moisés Selman. Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L1026–L1036, 2003. First published July 25, 2003; 10.1152/ajplung.00183.2003.—In this study, we examined the sequential expression of several matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), and growth factors as well as the presence of apoptosis in a model of pulmonary fibrosis induced in rats with paraquat and hyperoxia. Animals showing neither clinical nor morphological changes with this double aggression were classified as “resistant”. Rats were killed at 1, 2, 3, and 6 wk, and lungs were used for collagen content, gene expression by real-time PCR, gelatinolytic activity by zymography, apoptosis by in situ DNA fragmentation, and protein localization by immunohistochemistry. Our results showed a significant decrease of collagenases MMP-8 and MMP-13, with an increase of TIMP-1 and transforming growth factor- β . Immunoreactive TIMP-1 was increased in experimental rats and primarily localized in alveolar macrophages. Expression of gelatinases MMP-2 and MMP-9 mRNAs was not affected, but lung zymography revealed an increase in progelatinase B, progelatinase A, and its active form. Epithelial apoptosis was evident from the first week, whereas at later periods, interstitial cell apoptosis was also noticed. Resistant animals behave as controls. These findings suggest that an imbalance between collagenases and TIMPs, excessive gelatinolytic activity, and epithelial apoptosis participate in the fibrotic response in this experimental model.

gelatinases; tissue inhibitor of metalloproteinases-1

PULMONARY FIBROSIS is the final result of many severe lung injuries, and it is characterized by an initial diffuse inflammatory reaction or epithelial injury/activation followed by fibroblast/myofibroblast proliferation and extracellular matrix accumulation (34). The molecular mechanisms involved in the extensive structural disorganization/remodeling that characterize the fibrotic response are not completely understood but probably involve disequilibrium of some matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) (33, 36, 45).

The MMP family consists of 23 human enzymes that collectively degrade extracellular matrix components and exert selective proteolysis of cell surface receptors, adhesion molecules, chemokines, cytokines, and growth factors (28, 30, 58). Human MMPs have been classified into six different subgroups of closely related members with rather distinctive but often overlapping substrate specificities: collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane type MMPs, and other MMPs. Collagenases (MMP-1, MMP-8, and MMP-13) degrade mainly fibrillar collagens, whereas gelatinases (MMP-2 and MMP-9) have, among others, substrate affinity for basement membrane type IV collagen. The TIMP family is composed of four members (-1, -2, -3, and -4) that bind to the active site of MMPs. In addition to their inhibitory effects on MMPs, some of them show other properties, such as association with latent MMPs, cell growth-promoting activity, cell survival-promoting activity, and apoptosis (3, 15, 16, 29, 58).

Importantly, modifications in MMP and TIMP expression or activity may participate in not only enhancing the exaggerated accumulation of extracellular matrix, but also through the disruption of the basement membranes that seems to play a role in lung fibrogenesis (13, 33, 39, 42). MMPs and TIMPs are regulated by a number of growth factors. Transforming growth factor (TGF)- β inhibits MMP-1 and stimulates TIMP-1 production (19, 27, 38). Its downstream gene transcriptional activity includes an increase in connective tissue growth factor (CTGF) (49). Other important profibrotic or matrix modulating genes are platelet-derived growth factor (PDGF) and angiotensin, which have also been implicated in human and/or experimental fibrosis (2, 9, 24, 46).

On the other hand, a considerable body of literature suggests that the integrity of the alveolar epithelium and alveolar apoptosis is a critical determinant in the pathways that initiate fibrogenesis in the lung (1, 11, 17, 18, 20, 51, 52). Alveolar epithelial cells express functional Fas, and activation of Fas in vivo induces epithelial cell apoptosis and lung fibrosis in mice (11, 17, 18). Likewise, fibroblasts from human fibrotic lungs

Address for reprint requests and other correspondence: M. Selman, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, México DF, CP 14080, México (E-mail: mselman@sni.conacyt.mx).

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.

induce epithelial apoptosis, and fibroblastic foci are usually found close to abnormal or denuded alveolar epithelium (51, 52).

With these precedents, our aims were: 1) to determine the sequential expression of MMP-8 and MMP-13 (collagenases-2 and -3), MMP-2 and MMP-9 (gelatinases A and B), TIMP-1, -2, and -3, TGF- β 1, CTGF, angiotensin, and PDGF-A in an established rat model of pulmonary fibrosis, and 2) to define the timing and location of cell apoptosis. We report here that progression to fibrosis is characterized by decreased expression of MMP-8 and MMP-13, with increased expression of TIMP-1 and TGF- β 1, and persistent alveolar epithelial apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Experimental model. The experimental model of diffuse pulmonary fibrosis was developed in rats as described previously (7, 44). Wistar male and female rats were obtained from the same source at the same time and reproduced in our animal facility by the simple rotation method of breeding. Because the Wistar rat is an outbred strain, we used a breeding system known as "minimum inbreeding for the bred" (4). Adult rats, weighing 200–250 g, received 2.5 mg/kg of paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium; Sigma Chemical, St. Louis, MO) twice weekly for 6 wk through intraperitoneal injections. During all 6 wk, rats were placed into a 160-liter Plexiglas exposure chamber that was continuously ventilated with a mixture of oxygen and room air that maintained O₂ concentration at 80%. In these chambers, the animals had sufficient space to move around and to drink and eat normally. Control animals received 1.5 ml of saline solution intraperitoneally and were exposed to room air during the experimental period. The protocol was approved by the Ethical Committee on Use and Care of Animals from the National Institute of Respiratory Diseases (Mexico).

Animal body weights were recorded every week, and visual examination of animal health was made daily. Animals exposed to 80% oxygen plus episodic administration of paraquat were killed beginning at 1, 2, 3, and 6 wk of exposure. Control animals were exposed to the paraquat vehicle and room air. Eight animals were studied at each time interval. Animals displaying low body weight together with respiratory insufficiency manifested by bradypnea, nasal twitching, and/or cyanosis were killed at the earliest designated sampling interval. Additionally, eight resistant rats were also studied. Resistant rats were defined as animals that received 6 wk of paraquat plus hyperoxia but gained weight, did not develop signs of respiratory insufficiency, and morphologically showed minimal lung lesions or no lesions at all.

After death, the left lungs were used for morphology, immunohistochemistry, and collagen determination, whereas the right lungs were used for Northern blot, real-time PCR, and lung tissue zymography. Because the model is characterized by diffuse inflammatory lesions followed by widespread fibrotic reaction involving both lungs (43, 44), we considered that lung sampling for all analyses represented the overall lesions.

Morphology. For histology and immunohistochemistry, the left lungs were instilled through a tracheal cannula at a constant pressure of 7 cmH₂O with 4% paraformaldehyde in PBS and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome.

Detection of DNA fragmentation in situ. Cell death was explored in control and experimental lung tissues with a

DNA fragmentation detection kit (Klenow-FlagEL; Oncogene, Darmstadt, Germany) following the manufacturer's instructions. Briefly, deparaffinized lung sections were incubated with 100 μ l of 20 μ g/ml proteinase K at room temperature for 20 min. Samples were rinsed with 1 \times Tris-buffered saline (TBS) and incubated with 1 μ g/ μ l of DNase I in 1 \times TBS/1 mM MgSO₄ at room temperature for 20 min. Endogenous peroxidase was inactivated with 30% H₂O₂ in methanol. Specimens were then covered with 1 \times Klenow equilibration buffer at room temperature for 30 min, following with 60 μ l of Klenow labeling reaction mix. The slides were incubated in a humidified chamber at 37°C for 1.5 h. Samples were covered with 100 μ l of blocking buffer at room temperature for 10 min, incubated with 100 μ l of diaminobenzidine at room temperature for 15 min, and counterstained with 100 μ l of methyl green.

Hydroxyproline measurement. Lung fragments from controls and paraquat plus oxygen-exposed rats were analyzed for hydroxyproline content as an estimate of collagen content. Lung samples were dried and hydrolyzed in 1 ml of 12 N HCl for 24 h at 110°C, and hydroxyproline colorimetric analysis was performed as described by Woessner (57). All assays were done in triplicate, and data are expressed as micrograms of hydroxyproline per milligram of lung tissue.

Immunohistochemistry. Immunoreactive TIMP-1 was identified in lung tissue sections as previously described (36, 45). Briefly, after deparaffinized tissue sections were rehydrated and blocked with 3% H₂O₂ in methanol followed by antigen retrieval in a microwave in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, for 5 min. Tissue sections were treated with an antibody diluent with background reducing components (Dako, Carpinteria, CA) diluted 1:100 in PBS and then incubated with anti-TIMP-1 antibody (rabbit polyclonal; 200 μ g/ml diluted 1:100; 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's instructions. 3-Amino-9-ethyl-carbazole (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.

Lung tissue gelatin zymography. Lung samples (20 mg/ml) from control and experimental animals were homogenized in 10 mM 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (Sigma), 20 mM HEPES, pH 7.5, plus 150 mM NaCl. After centrifugation, aliquots of supernatants containing 10 μ g of protein were used to analyze lung tissue gelatinase activity in a gelatin substrate SDS gel as previously described (33). Serum-free conditioned medium from human lung fibroblasts and from U2-OS cells stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate were used as MMP-2 and MMP-9 markers, respectively. Like gels were incubated but in the presence of 20 mM EDTA. Gelatinolytic activities were quantified using 1D image analysis software (Eastman Kodak, Rochester, NY) considering the area and intensity of lysis bands. Results were expressed as relative units (net intensity $\times 10^{-4}$ per 10 μ g of lung protein).

Detection of TGF- β 1 by ELISA in lung extracts. Aliquots of supernatants obtained from lung homogenates were used to determine biologically active and total TGF- β 1 by using an immunoassay system (Promega, Madison, WI). Activation of the latent form to detect total (active + latent) protein was performed by acid treatment following the manufacturer's instructions.

RNA isolation and Northern blot analysis. Total RNA was extracted from lung tissue using TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, NY). RNA quality was assessed by

Table 1. Genes and primers for real-time PCR

Gene	Sense Primer (5' to 3')	Reverse Primer (5' to 3')	Product bp	Reference or Accession No.
R18S	GTAAGCCGTTGAACCCGATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	140	(40)
MMP-13	CATCCATCCCGAGACCTCAT	GCATGACTCTCACAATGGCA	324	M60616
MMP-2	CTATTCTGTGACACTTTGG	CAGACTTTGGTCTCCAACCTT	309	(56)
MMP-9	AAATGTGGGTGTACACAGGC	TCCTTGGGGCTCTCAATTTT	309	(56)
TIMP-1	GACCACCTTATACCAGCGTT	GTCACTCTCCAGTTTGCAAG	333	L29512
TIMP-2	CAACCCCATCAAGAGGATT	CGAAGAACCATCACTTCTC	416	U14526
TIMP-3	CAGTACATTCACCGGAAGC	TCTGTGGCATTGCTGTGCT	392	NM000362
TGF- β 1	TGGAAGTGGATCCAGCGCCCAAGG	GCAGGAGCGCAGATCATGTTGGAC	242	(31)
PDGF-A	AAGCATGTGCCGGAGAAGCG	TCCTCTAACCTCACCTGGAC	305	(10)
CTGF	CCGATCCGAGCTTTCTGGCTGCACC	GGCTGCAGTCTCCGTACATCTTCCTG	250	A gift from J. Lasky, Tulane Univ.
Angiotensin	GTTTGTTTGGACACACTGGGGT	ACAAGGGGACAGTGTGCATT	174	M121112.1

resolution on denatured 1% agarose gels and measurement of absorbance ratios at 260/280 nm. Total RNA (15 μ g/lane) was fractionated on a 1% agarose gel containing 0.66 M formaldehyde (8). rRNA was visualized with ethidium bromide, and the fractionated RNA was transferred onto a Nytran transfer membrane (NEN, Boston, MA) by capillary blotting overnight. RNA was immobilized by being baked at 80°C for 2 h and then prehybridized at 42°C for 18 h in 5 \times SSC, 50% formamide, 5 \times Denhardt's solution, and 0.5% SDS containing 100 μ g/ml of denatured salmon sperm DNA. Hybridization was carried out at 42°C for 18 h in hybridization buffer containing 50% dextran sulfate plus heat-denatured 32 P-labeled cDNA probes. Membranes were washed in 2 \times SSC, 0.1% SDS at 42°C, followed by 0.25 \times SSC, 0.1% SDS at 55°C and 0.1 \times SSC, 0.1% SDS at 65°C. After being dried, membranes were exposed to Kodak BIOMAX MS film at -70°C with an intensifying screen. Equal loading of RNA samples was monitored by assessing the mRNA level of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The cDNA probes were radiolabeled with [32 P]dCTP to specific activity of 200 \times 10⁶ dpm/ μ g using a multiprime DNA labeling kit (NEP-103; Dupont, Wilmington, DE).

RT-PCR and quantitative real-time PCR amplification. One microgram of total RNA was reverse transcribed using 2 μ g of random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase according to the manufacturer's protocol (Advantage RT-for-PCR Kit; Clontech, Palo Alto, CA).

Quantitative real-time PCR amplification was performed using i-Cycler iQ Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). PCR was performed with cDNA working mixture in a 25- μ l reaction volume containing 3 μ l of cDNA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 1 μ M specific 5' and 3' primers, 1.25 units of Taq DNA polymerase (Roche, Branchburg, NJ), and 10 nM fluorescein and dye SYBR green I 1:50,000 (Roche, Indianapolis, IN). A dynamic range was built with each product of PCR on copy number serial dilutions of 1 \times 10⁸, 1 \times 10⁶, 1 \times 10⁴, 1 \times 10², and 1 \times 10; all PCRs were performed in triplicate. Standard curves were calculated referring the threshold cycle (the PCR cycle at which a specific fluorescence becomes detectable) to the log of each cDNA dilution step (40, 47, 54). Results were expressed as the number of copies of the target gene normalized to 18S rRNA. Results are shown as percent of controls.

Some primers for PCR reactions were obtained from previously published rat sequences (10, 31, 40, 56), whereas the rest were outlined with <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/epimer3.html> and analyzed for specificity in Basic Local Alignment Search Tool (Table 1). All primers were obtained from GIBCO-BRL (Life Technologies). The cycling conditions for PCR amplification to MMP-2, MMP-9, MMP-13, CTGF, PDGF-A, and angiotensinogen were performed

using the following protocol: initial activation of Amplitaq Gold DNA polymerase at 95°C for 7 min, 40 cycles of denaturation to 95°C/30 s, annealing to 58°C/30 s, and extension to 72°C/30 s. For amplification of TIMP-1, -2, -3, and TGF- β 1, the annealing temperature was increased to 60°C. Specific amplification was confirmed by the presence of one single peak in the melting curve plots. Additionally, the PCR products were analyzed in agarose gel electrophoresis.

Statistical analysis. Values are expressed as means \pm SE of the mean. Differences between experimental groups and controls were analyzed by using Dunnett's test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

General characteristics. Two clinical/morphological responses were manifested in the animal group receiving paraquat plus 80% oxygen. 1) Animals termed "susceptible" exhibited constant loss of body weight and progressive respiratory insufficiency beginning at 1 or 2 wk of exposure; some of these susceptible rats suffered acute weight loss and severe respiratory distress. 2) Approximately 20% of the exposed animals did not present weight loss, although they did not gain weight at the same rate as controls (Table 2) and showed no discernible respiratory symptoms throughout the 6 wk of exposure, when they were killed. These rats were named "resistant".

Histology and in situ DNA fragmentation. Morphological changes of the lung parenchyma at each sampling time are shown in Fig. 1. Control animals at all time points exhibited normal alveolar architecture (Fig. 1A). At 1 wk of exposure, multifocal interstitial and alveolar inflammation was observed, as was cuboidalization of the alveolar epithelium. Inflammation included polymorphonuclear and mononuclear cells (Fig. 1B). At 2 and 3 wk of exposure, the inflammatory process was predominantly mono-

Table 2. Body weight at death

	0 wk	1 wk	2 wk	3 wk	6 wk
Control	198 \pm 13	207 \pm 4	252 \pm 16	278 \pm 14	291 \pm 15
Susceptible	207 \pm 11	190 \pm 18	185 \pm 9	170 \pm 10	165 \pm 16
Resistant	202 \pm 9	205 \pm 11	223 \pm 14	236 \pm 17	264 \pm 19

Values are means \pm SE. Body weight measured in grams. Eight susceptible animals were killed at each time point. Eight resistant rats were killed at 6 wk.

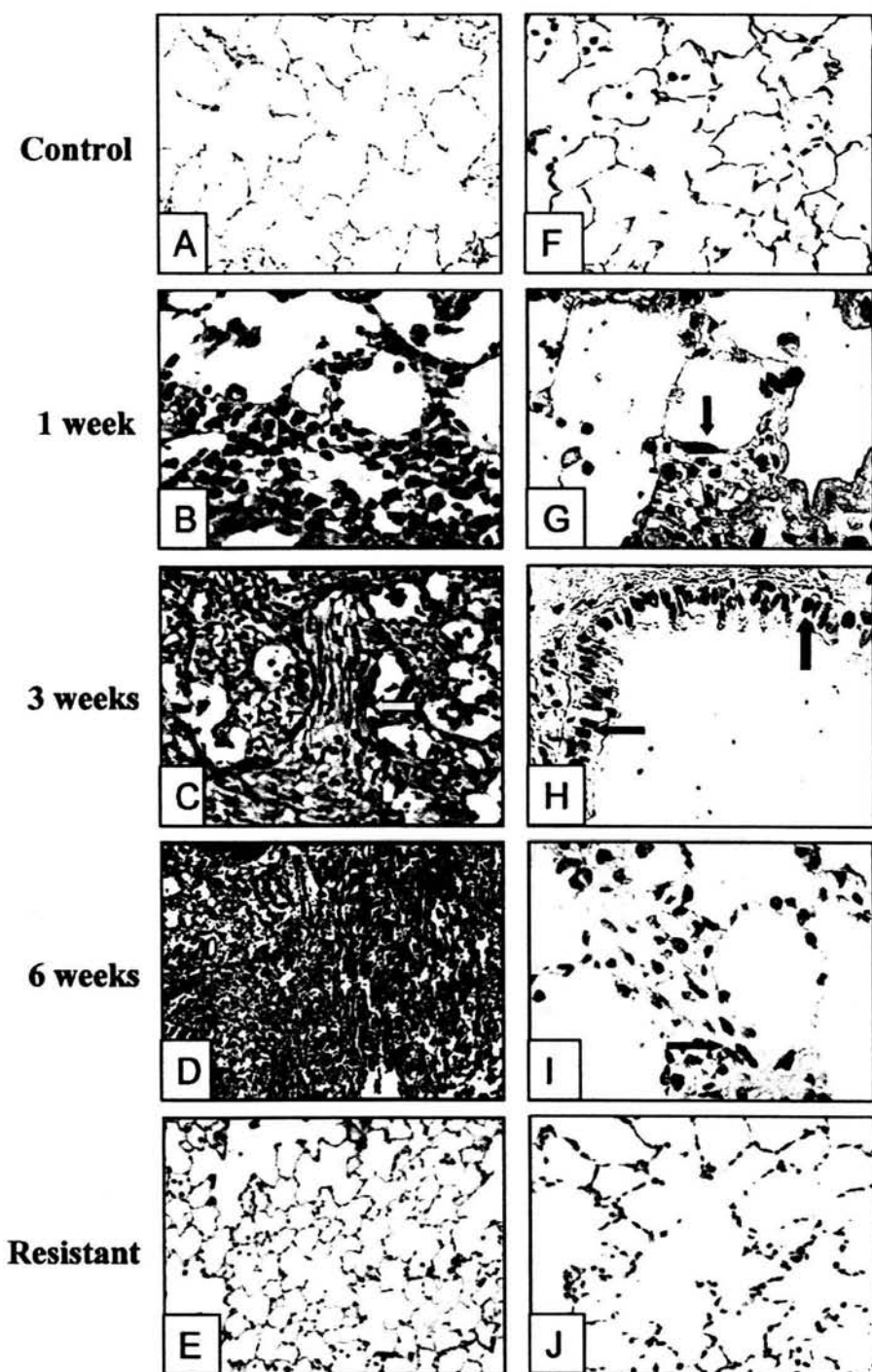


Fig. 1. Histology and in situ DNA fragmentation in control and experimental lungs. Deparaffinized lung sections from animals killed at the indicated sampling intervals were prepared for hematoxylin and eosin and Masson's trichrome staining (left; A and C, 20 \times original magnification; B, 40 \times ; D and E, 10 \times) or for in situ DNA fragmentation (right; F and J, 20 \times ; G-I, 40 \times). A fibroblastic focus is indicated by the arrow in C. In G-I, brown nuclei represent apoptotic cells (arrows), whereas green nuclei correspond to living cells.

nuclear, with interstitial and intra-alveolar lymphocytes and macrophages. Foci of densely packed interstitial fibroblasts were also found (Fig. 1C, arrow). At 6 wk, cell infiltrate was similar, but a more extensive collagen deposit was observed as was the severe loss of parenchymal lung architecture (Fig. 1D). Resistant animals exhibited normal alveolar structures with minimal or no inflammation or fibrosis, and, in general, resembled that of control animals (Fig. 1E).

In situ DNA fragmentation showed apoptotic cell death from the first to the sixth week (Fig. 1G). Apoptosis was diffusely distributed in the lung parenchyma and was mainly noticed in alveolar epithelial and bronchiolar cells (Fig. 1, G and H). At longer periods (6 wk), apoptotic nuclei were also observed in interstitial cells (Fig. 1I). Areas of intra-alveolar apoptotic inflammatory cells were also seen throughout the experiment. Resistant rats behaved as con-

trols (Fig. 1F), and few, if any, apoptotic cells were found (Fig. 1J).

Lung collagen expression and content. Paraquat plus oxygen-exposed rats showed a progressive increase of lung collagen when compared with control animals, paralleling morphological results. As illustrated in Fig. 2A, lung collagen quantified by hydroxyproline was ~50% increased over control levels at the third and sixth weeks ($P < 0.05$). Resistant rats showed normal values. Similarly, paraquat plus hyperoxia exposure resulted in a marked upregulation of pro- $\alpha_1(I)$ collagen transcript levels that was also observed at the third and sixth weeks (Fig. 2B).

Real-time PCR. An example of a real-time PCR experiment is shown in Fig. 3A. The reaction was linear over nine orders of magnitude of starting cDNA standards, with a detection sensitivity of 10 molecules and efficiency of 95.3% (Fig. 3A). Correlation coefficients of such standard curves were consistently >0.99 . Figure 3B illustrates the melt-curve plot of the amplified PCR cDNAs shown in Fig. 3A, demonstrating the amplification of one specific product.

Levels of MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TGF- β 1, PDGF-A, CTGF, and angiotensinogen gene expression were assessed by quantitative real-time PCR in aliquots from whole lung homogenates of experimental and control rats. The effect of paraquat plus hyperoxia treatment was selective and showed temporal differences. Regarding MMPs (Fig. 4), the most marked effect was a significant reduction in the mRNA expression of both collagenases MMP-8 and MMP-13 from the first to the sixth week compared with controls (Fig. 4, A and B). Resistant rats showed no significant changes compared with control animals. No significant difference in lung gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) mRNA expres-

sion was found between controls and experimental samples (not shown).

As illustrated in Fig. 5, TIMP-1 exhibited a significant increase from the second week until the final period of the experiment. Resistant rats did not show differences with controls. By contrast, TIMP-2 and TIMP-3 showed no changes at any time (not shown).

TGF- β 1 gene expression showed a significant increase from the first- until the third-week interval of paraquat plus oxygen exposure (Fig. 6A). Likewise, analysis of lung homogenates revealed a significant increase of total (active and latent) TGF- β 1 protein levels at 2 and 3 wk ($P < 0.01$ and 0.05 , respectively; Fig. 6B). The majority of this protein was in the latent (inactive) form, measurable in the bioassay only after acid activation. The amount of spontaneously active TGF- β 1 was low (5–10 ng/ml) and was found elevated in the experimental animals at 2 wk of paraquat plus oxygen exposure ($P < 0.05$; Fig. 6C). Levels of resistant rats were similar to controls. PDGF-A, CTGF, and angiotensinogen mRNA levels showed no differences with control lungs (not shown).

Lung localization of TIMP-1 by immunohistochemistry. Immunoreactive TIMP-1 was not detected in normal lungs (Fig. 7A). By contrast, lungs from rats injured with paraquat plus hyperoxia showed, from the first week on, increased TIMP-1 expression mainly localized in alveolar macrophages and occasionally in bronchiolar and alveolar epithelial cells and in smooth muscle cells from vessels (Fig. 7, B–D). No differences in TIMP-1 cell localization were observed with the progression of the lung lesions, but the inhibitor was primarily noticed in injured areas. Negative controls incubated with nonimmune serum were negative (Fig. 7E).

Lung tissue zymography. Aliquots of lung tissue extract supernatants from control and experimental animals containing ~10 μ g of protein were used. A representative zymogram showing two samples from each time period is represented in Fig. 8. Compared with control rats, experimental animals receiving the double aggression showed from the first week on an increase in pro-MMP-2 and its active form represented by the lower molecular band of ~62 kDa. A two- to threefold increase was revealed by densitometric quantification of the surface and intensity of lysis bands of zymograms derived from five different animals in each group (Fig. 8). Resistant animals behaved similarly to control. Likewise, an increase in the band corresponding to MMP-9 was noticed mainly at 3 and 6 wk in most injured animals (Fig. 8). At these periods, densitometric quantification showed a twofold increase compared with controls. A mild increase was observed in some resistant animals, but no significant difference was observed when compared with controls.

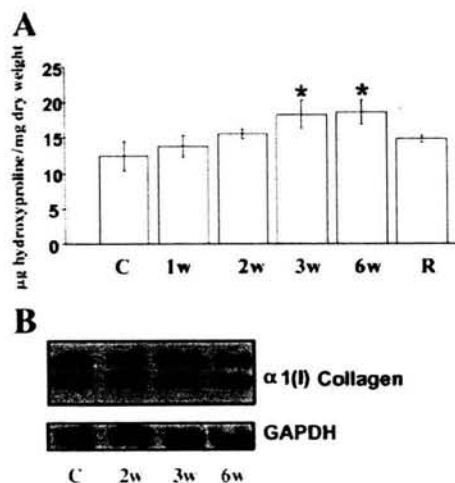


Fig. 2. Lung collagen quantification. A: relative content of hydroxyproline per dry weight. A significant increase of hydroxyproline can be observed after the 3rd wk (w) of exposure to paraquat and hyperoxia. The resistant (R) animals behave as unexposed animals. $*P < 0.05$. B: Northern blot analysis showing upregulation of $\alpha_1(I)$ collagen expression at 3 and 6 wk. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. C, controls.

DISCUSSION

As discussed earlier (43, 44), an acceptable experimental model of diffuse interstitial pulmonary fibrosis should 1) be progressive and potentially lethal; 2) de-

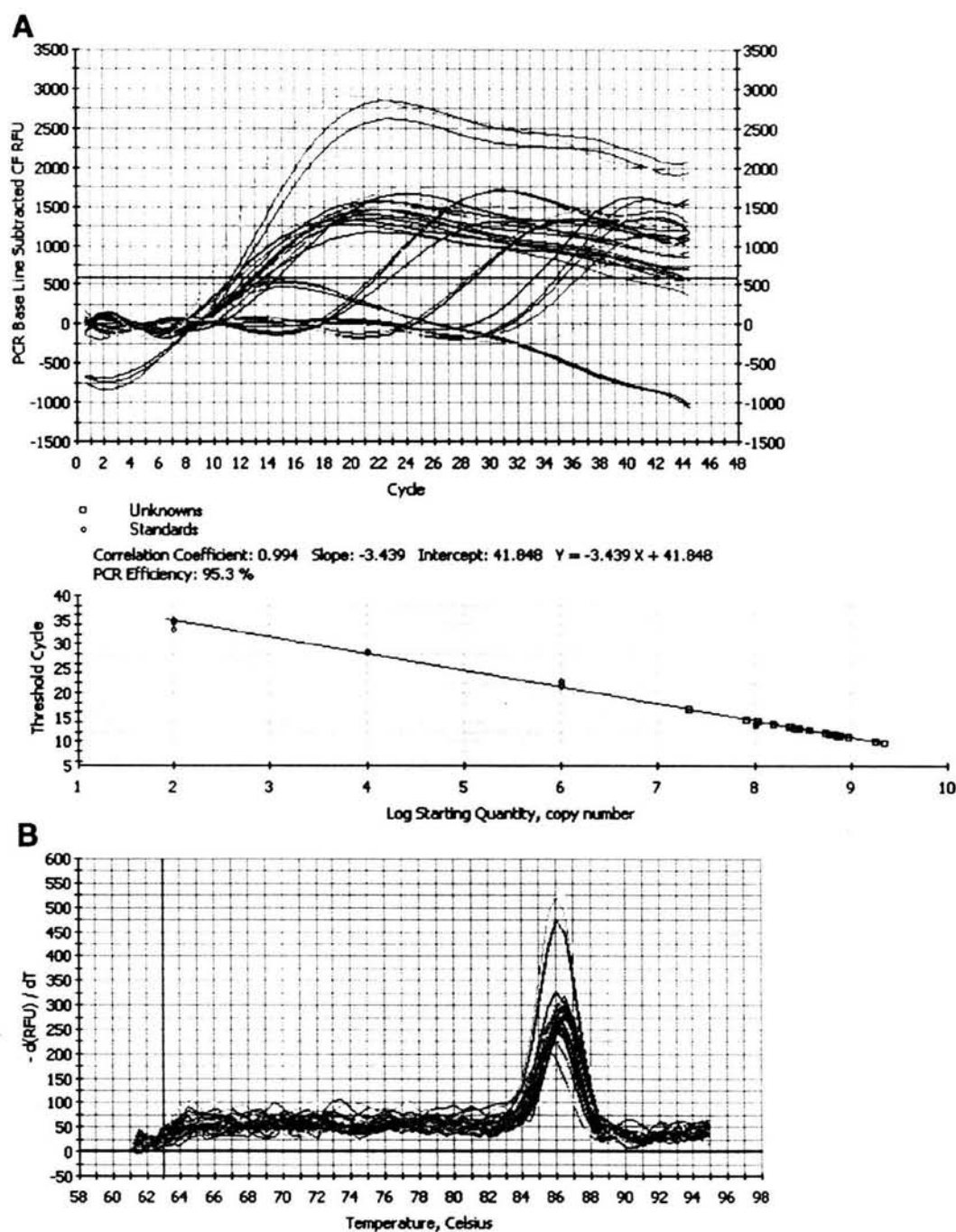


Fig. 3. *A, top*: amplification of R18S detected by changes in fluorescence (CF RFU) in a real-time PCR setting. Thirty-six samples in triplicate were assayed against 5 DNA standards spanning 8 logs. *A, bottom*: standard curve of threshold cycle against known quantities of DNA standards. *B*: melt-curve plots representing products from the amplification shown in *A*.

velop clinical and functional data of pulmonary insufficiency; and 3) resemble the histological features of the human disease. Previous morphological and biochemical characterization of the model used here demonstrated that each of these criterion is fulfilled (44).

An important additional observation in the present study was the finding of resistant animals. Thus his-

tology and collagen accumulation data suggest that although most animals appeared to be susceptible to the combination of paraquat plus hyperoxia, others survived 6 wk with only minor or no lesions at all. These resistant rats displayed weight gain and complete lack of respiratory insufficiency throughout the exposure period. Although it is theoretically feasible

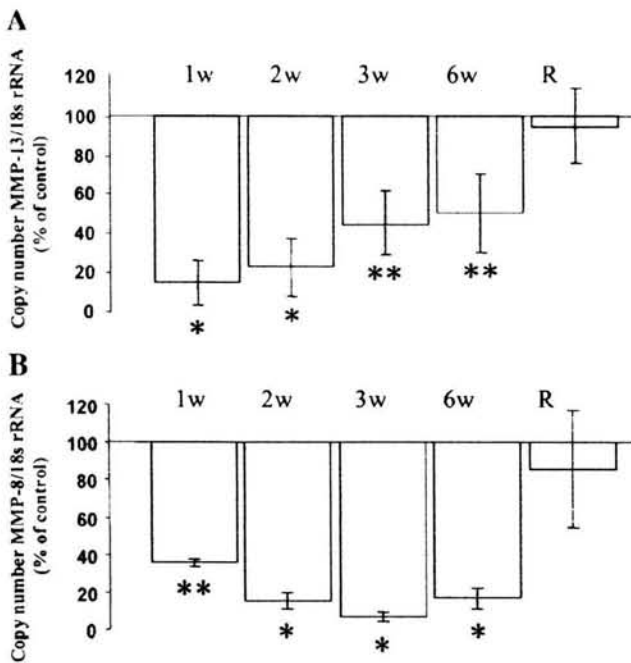


Fig. 4. Quantitative real-time PCR. Gene expression of matrix metalloproteinases (MMP)-13 (A) and MMP-8 (B) normalized for R18S rRNA in 6–8 control and experimental lung cDNA samples. Results are expressed as percent of controls. * $P < 0.01$; ** $P < 0.05$.

that some animals surviving 6 wk had developed at earlier time points more severe lesions from which they recovered before death, a sequential analysis of body weights at earlier time points does not support such an interpretation.

Lung fibrosis may be regarded as pathological wound repair after injury with excessive fibroproliferation and accumulation of extracellular matrix. Nevertheless, the molecular mechanisms involved in the extensive structural remodeling that characterizes the fibrotic response are not completely understood. However, a growing body of evidence strongly suggests that abnormal expression/activity of MMPs and TIMPs plays a role in this process (13, 33–36, 45). In this work, a

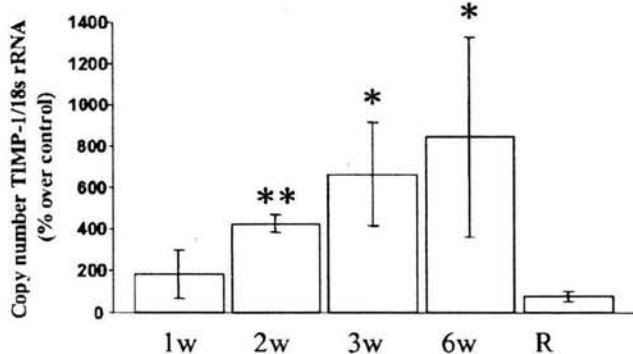


Fig. 5. Comparison of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 mRNA levels relative to 18S rRNA in control and experimental rats using real-time PCR. A significant increase of the target gene is observed from the 2nd wk. ** $P < 0.05$; * $P < 0.01$.

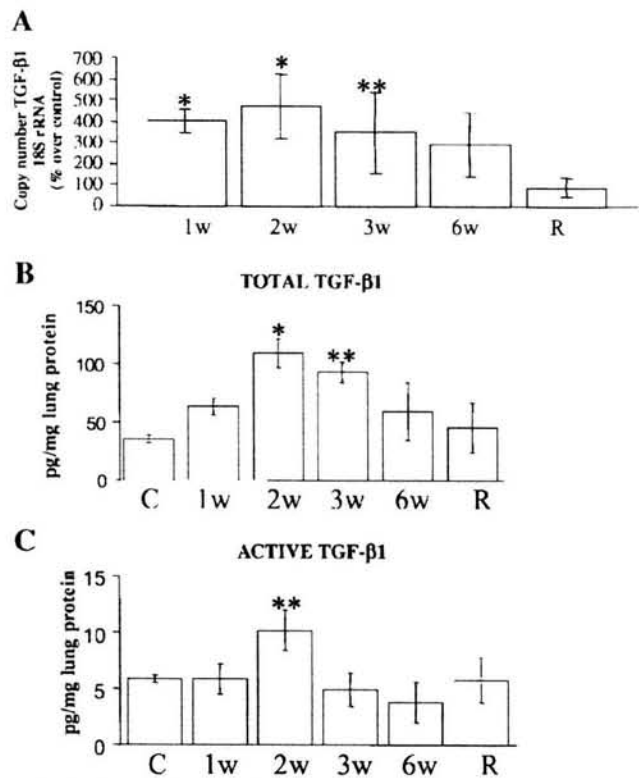


Fig. 6. A: real-time PCR for transforming growth factor (TGF)- β 1. An increased gene expression is observed in the first 3 wk. * $P < 0.01$; ** $P < 0.05$. B and C: levels of active and total (active + latent) TGF- β 1 in lung homogenates. * $P < 0.01$; ** $P < 0.05$. C, control.

noteworthy decreased expression of the two major collagenases present in adult rat, equivalent orthologs of human neutrophil collagenase (MMP-8) (5) and collagenase-3 (MMP-13) (12), was observed. These enzymes share the unique ability to cleave the native helix of fibrillar collagens, which are the most abundant proteins in fibrotic tissues. In addition, we found that TIMP-1 expression was increased in parallel to fibrosis development. These findings support the notion that an imbalance between the process of matrix degradation and their inhibition actively participates in the development of lung fibrogenesis and that progression of fibrosis is associated with inhibition of matrix breakdown. Interestingly, resistant animals showed no changes in collagenases or TIMP-1 expression compared with control rats.

Studies regarding the putative role of MMP-8 or neutrophil collagenase in pulmonary fibrosis are lacking. MMP-8 preferentially degrades type I collagen, and it has been recently suggested that this enzyme, when cloned in an adenoviral vector and delivered to cirrhotic rat livers, is able to markedly reverse the fibrotic lesion (14). Likewise, although high levels of MMP-8 have been found in bronchoalveolar lavage from patients with idiopathic pulmonary fibrosis, the presence of this enzyme in situ is practically nonexistent (21, 45).

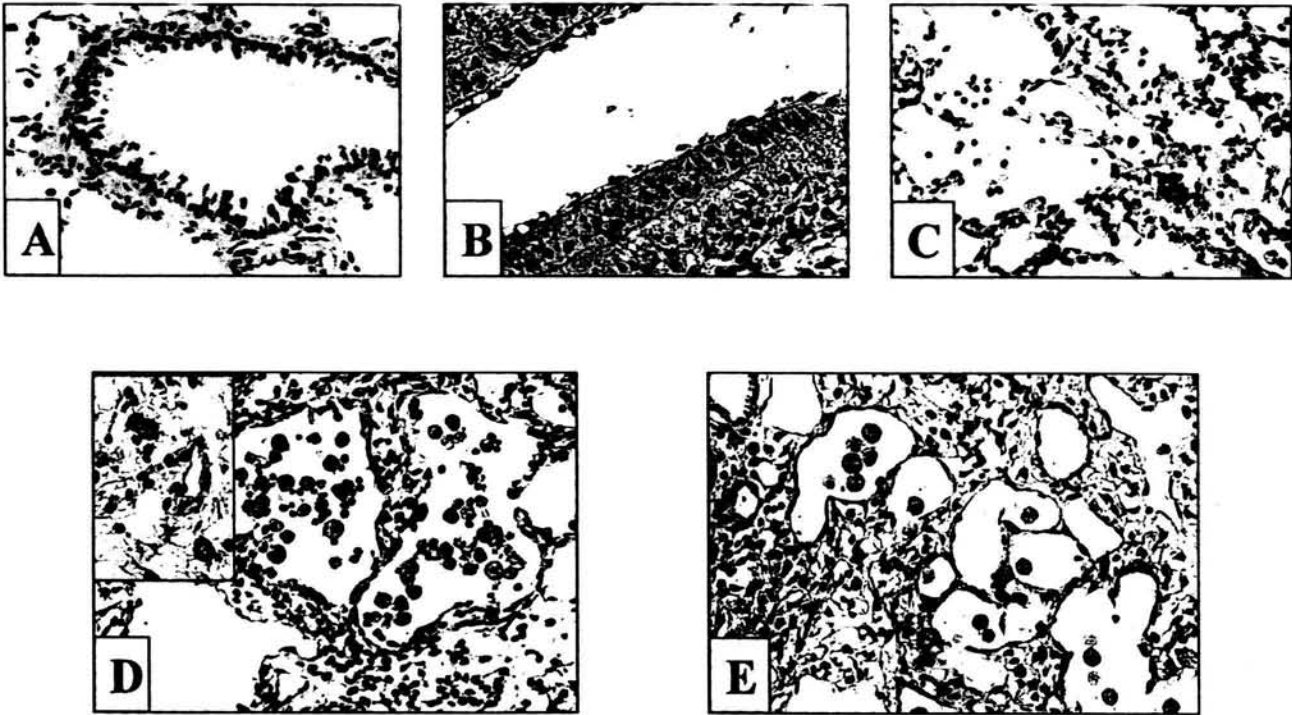


Fig. 7. TIMP-1 immunolocalization in experimental and control lungs. *A*: no signal is observed in normal lung. *B*: TIMP-1 immunoreactive bronchiolar epithelial cells after 2-wk exposure to paraquat and hyperoxia. *C*: immunoreactive signal in some inflammatory and alveolar epithelial cells. *D*: positive free alveolar macrophages. *Inset*: 2x intensely stained interstitial macrophages. *E*: negative control omitting the primary antibody.

On the other hand, remodeling of fibrillar collagen in mouse and rat tissues has been widely attributed to the activity of MMP-13, the main collagenase identified in this species. In humans, MMP-13 was originally identified in breast carcinoma (12) and is characterized by a potent degrading activity against a wide spectrum of extracellular matrix proteins besides fibrillar collagen. MMP-13 has been suggested to play a major role in the pathogenesis of tissue destruction in rheumatoid arthritis (37). However, its expression has not been revealed in human normal or fibrotic lung tissue (45).

MMP-13 gene expression has been previously evaluated in bleomycin-induced fibrosis in mice, but in contrast to our findings, no changes were found (48). In the present study, we also looked for murine collagenase-like A, the putative ortholog of human MMP-1 in murines (6), but gene expression was found only in embryonic rat and not in adult normal or experimental lungs (not shown).

TIMP-1 gene expression was consistently upregulated in the injured rats evolving to fibrosis. The inhibitor was primarily expressed on alveolar macrophages but also in alveolar epithelial cells, and it was spatially restricted to areas of lung injury. In this context, it is important to emphasize that TIMP-1 seems to play a major role in lung fibrosis in rodents. This inhibitor has been shown to be markedly upregulated during experimental lung fibrosis, and it even seems to be selectively and markedly increased in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis (25, 48). Fur-

thermore, high levels of TIMP-1 are present early after bleomycin exposure and persist for weeks after the initial insult (25). Moreover, it has been recently demonstrated that a crucial difference between a fibrosis-prone and a fibrosis-resistant mouse strain after transient lung overexpression of active TGF- β 1 is associated with the regulation of TIMP-1 (22). Thus the susceptible C57BL/6 showed a strong upregulation of TIMP-1 gene in their lungs in vivo and in their fibroblasts in vitro in contrast to a weak induction in the resistant BALB/c, suggesting that the differences in extent of lung fibrosis might be in part due to altered extracellular matrix turnover provoked by TIMP-1 expression.

In our study, the increased expression of TIMP-1 preceded increased accumulation of collagen, suggesting that fibrillar matrix proteins are laid down into a microenvironment in which matrix degradation is already reduced.

The mechanisms underlying the increase of TIMP-1 may be at least partially related to an upregulation of TGF- β , a prototype of a profibrotic factor found elevated at the gene and protein level during the first 3 wk. It is well known that the fibrogenic effect of TGF- β is not only caused by stimulation of matrix synthesis but also by a complex regulation of MMP and TIMP interaction, including stimulation of TIMP-1 expression (19, 27, 38). It is important to emphasize that although TGF- β provokes a decrease of expression of MMP-1 and MMP-8, it seems to be a potent inducer of

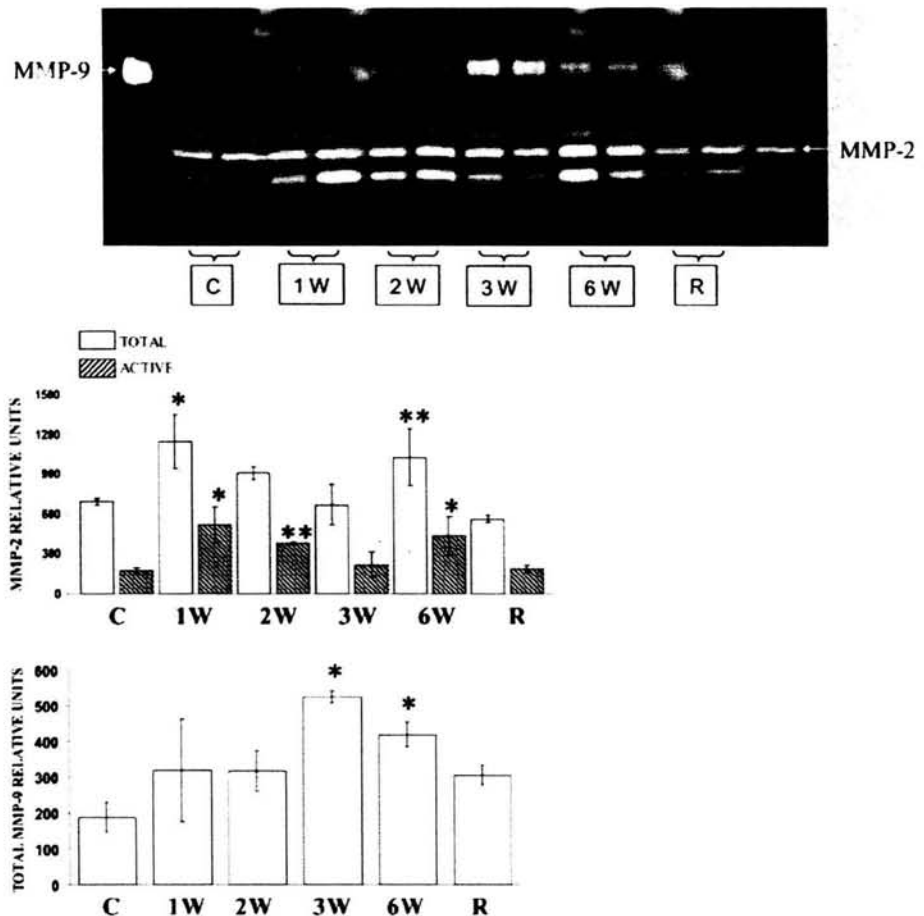


Fig. 8. Lung tissue zymography. Samples containing $\sim 10 \mu\text{g}$ of protein were mixed with an equal volume of sample buffer containing 3% SDS. Zones of enzymatic activity appear as clear bands over a dark background. Gelatinolytic activity bands were inhibited by EDTA. Serum-free conditioned medium from human lung fibroblasts was used as MMP-2 marker (*middle*) and from phorbol 12-myristate 13-acetate-stimulated U2-OS cells as marker of MMP-9 (*bottom*). * $P < 0.01$; ** $P < 0.05$. paraquat + hyperoxia-susceptible-exposed animals after 1, 2, 3, and 6 wk (1W, 2W, 3W, 6W).

MMP-13 gene expression, at least in vitro (32, 53). However, in vivo studies using transgenic mice overexpressing TGF- β have suggested a downregulatory effect (41).

MMP-2 did not display changes in gene expression; however, an important increase mainly in the lung active form was observed from the beginning of the double aggression. This finding would suggest an upregulation of membrane type 1 MMP (30, 58). Results regarding MMP-9 were to some extent paradoxical. Thus whereas no changes were observed at the gene expression level, an increase of MMP-9 protein was noticed in zymograms. This finding may be attributed, at least partially, to the leukocyte infiltrate since these cells carry the preformed enzyme in specific granules (30, 58). MMP-2 and MMP-9 activities have broad substrate specificity, which includes type IV collagen, the main component of basement membrane, and increased activities of these enzymes may contribute to its disruption. In this context, it has been suggested that epithelial basement membrane integrity plays an important role in determining normal lung reepithelialization or a fibrotic response (34). In bleomycin-induced lung fibrosis, a coincidental increase of MMP-9 activity and disruption of the alveolar epithelial basement membrane have been found (59). Interestingly,

both MMPs have been found elevated in human pulmonary fibrosis (13, 44). Additionally, it is important to emphasize that gelatinases have other non-matrix substrates that can enhance a fibrotic reaction. Thus, for example, cell surface-localized MMP-9 is able to proteolytically cleave latent TGF- β , providing a potentially important mechanism for TGF- β activation and tissue remodeling (60).

Alveolar epithelial loss, putatively caused by apoptosis, is a common finding in pulmonary fibrosis, and several mechanisms seem to be involved (11, 17, 18, 52). Lung fibroblasts obtained from patients with idiopathic pulmonary fibrosis induce alveolar epithelial cell apoptosis by secreting angiotensin peptides (55), whereas Fas-signaling pathway has been found upregulated in epithelial cells from both human and experimental fibrotic lungs (11, 18, 26). Actually, it has been demonstrated that a single instillation of bleomycin leads to the appearance of apoptosis in bronchial and alveolar epithelial cells that in turn is accompanied with a progression of fibrosis (18). In our study, increased apoptotic epithelial cell death was observed from the first week and continues for >6 wk of paraquat plus hyperoxia exposure, suggesting that may also play a role in the development of fibrosis, altering epithelium self-renewing. Importantly, although epi-

thelial cells within lesions undergo heavy labeling of fragmented DNA, this process was less intense in normal regions of the parenchyma, which is consistent with a pivotal role for apoptosis in determining the rate of epithelial repair (50). Interestingly, resistant rats mostly behave like control noninjured animals.

DNA fragmentation labeling of interstitial and alveolar inflammatory cells within lesions at all periods of the experiment was suggestive of clearance of these cells by apoptosis. Likewise, some interstitial apoptosis could also correspond to fibroblasts as part of the lung remodeling process.

In summary, we found a strong correlation between decreased gene expression of interstitial collagenases and increased gene expression of TIMP-1 and TGF- β with morphological and biochemical evidence of extracellular matrix accumulation, suggesting that dysregulated matrix remodeling is likely to contribute to the pathology of paraquat plus hyperoxia-induced pulmonary fibrosis. Increases in gelatinolytic activity and epithelial apoptosis were also important features of this model that preceded the fibrotic response. The basis for differences in susceptibility among animals is at present unknown but will be an interesting topic for future inquiry.

REFERENCES

- Adamson IYR, Young L, and Bowden DH. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 130: 377–383, 1988.
- Antoniades NH, Bravo M, Avila R, Galanopoulos T, Neville J, and Selman M. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 86: 1055–1064, 1990.
- Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, and Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* 101: 1478–1487, 1998.
- Baker HJ, Lindsey JR, and Weisbroth SH. The laboratory rat. In: *Biology and Diseases*, edited by American College of Laboratory, New York: Academic, 1979 (Animal Medicine Series).
- Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Lopez JM, Alvarez J, Sanchez LM, Quesada V, Bordallo J, Murphy G, and Lopez-Otin C. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem* 273: 23959–23968, 1998.
- Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Lopez JM, Alvarez J, Sanchez LM, Quesada V, Bordallo J, Murphy G, and Lopez-Otin C. Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem* 276: 10253–10262, 2001.
- Barrios R, Pardo A, Ramos C, Montano M, Ramirez R, and Selman M. Upregulation of acidic fibroblast growth factor during development of experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 273: L451–L458, 1997.
- Becerril C, Pardo A, Montano M, Ramos C, Ramirez R, and Selman M. Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1020–1027, 1999.
- Castoldi G, Di Gioia CR, Pieruzzi F, D'Orlando C, Van De Greef W, Busca G, Sperti G, and Stella A. ANG II increases TIMP-1 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H635–H643, 2003.
- Dobrian A, Wade S, and Prewitt R. PDGF-A expression correlates with blood pressure and remodeling in 1K1C hypertensive rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H2159–H2167, 1999.
- Fine A, Anderson N, Rothstein T, Williams M, and Gochoico B. FAS expression in pulmonary alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 273: L64–L71, 1997.
- Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, and Lopez-Otin C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269: 16766–16773, 1994.
- Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, and Yamana 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.
- Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, and Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 9: 127–134, 2002.
- Gómez D, Alonso D, Yoshiji U, and Thorgeirsson P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111–122, 1997.
- Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang L, Fukushima P, Mansoor A, and Stetler-Stevenson M. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 102: 2002–2010, 1998.
- Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, Kanika Y, and Hara N. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of FAS antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 272–278, 1997.
- Hagimoto N, Kuwano K, Nomoto Y, Kunitake R, and Hara N. Apoptosis and expression of FAS/FAS ligand mRNA in bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 91–101, 1997.
- Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, and Clark IM. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of TIMP-1 and MMP-1. Gene expression by transforming growth factor- β 1. *J Biol Chem* 278: 10304–10313, 2003.
- Haschek WM, Reiser KM, Klein-Szanto AJP, Last JA, and Witschi HP. Potentiation of butylated hydroxytoluene induced lung damage by oxygen: cell kinetics and collagen metabolism. *Am Rev Respir Dis* 127: 28–34, 1983.
- Henry MT, McMahon K, Mackarel AJ, Prikk K, Sorsa T, Maisi P, Sepper R, Fitzgerald MX, and O'Connor CM. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF. *Eur Respir J* 20: 1220–1227, 2002.
- Kolb M, Bonniaud P, Galt T, Sime PJ, Kelly MM, Margetts PJ, and Gauldie J. Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor- β 1 gene to lungs of "fibrosis-prone" and "fibrosis-resistant" mouse strains. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 141–150, 2002.
- Leivonen SK, Chantry A, Hakkinen L, Han J, and Kahari VM. Smad3 mediates transforming growth factor- β -induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. *J Biol Chem* 277: 46338–46346, 2002.
- Liu JY, Morris GF, Lei WH, Hart CE, Lasky JA, and Brody AR. Rapid activation of PDGF-A and -B expression at sites of lung injury in asbestos-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 129–140, 1997.
- Madtes DK, Elston AL, Kaback LA, and Clark JG. Selective induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 599–607, 2001.
- Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Matsuba T, Yoshimi M, Inoshima I, Yoshida K, and Hara N. Upregulation of Fas-signaling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 17: 180–189, 2001.
- Dobrian A, Wade S, and Prewitt R. PDGF-A expression correlates with blood pressure and remodeling in 1K1C hypertensive rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H2159–H2167, 1999.

- synthesis and degradation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1091: 231–235, 1991.
28. McCawley LJ and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Curr Opin Cell Biol* 13: 534–540, 2001.
 29. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, and Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 277: 11069–11076, 2002.
 30. Nagase H and Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491–21494, 1999.
 31. Napoli J, Prentice D, Niinami C, Bishop GA, Desmond P, and McCaughan GW. Sequential increases in the intrahepatic expression of epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor β in a bile duct ligated rat model of cirrhosis. *Hepatology* 26: 624–633, 1997.
 32. Palosaari H, Wahlgren J, Larman M, Ronka H, Sorsa T, Salo T, and Tjaderhane L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is downregulated by TGF- β 1. *J Dent Res* 79: 77–84, 2000.
 33. Pardo A, Barrios R, Maldonado V, Meléndez J, Ruiz V, Segura L, Sznajder JI, and Selman M. Gelatinases A and B are upregulated in lung rats by subacute hyperoxia. Pathogenic implications. *Am J Pathol* 153: 833–844, 1998.
 34. Pardo A and Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci* 7: d1743–d1761, 2002.
 35. Pardo A, Selman M, Ridge K, Barrios R, and Sznajder JI. Increased expression of gelatinases and collagenase in rat lungs exposed to 100% oxygen. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1067–1075, 1996.
 36. Pérez-Ramos J, Segura L, Ramírez R, Vanda B, Selman M, and Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in early and late lesions of experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1274–1282, 1999.
 37. Petrow PK, Wernicke D, Schulze Westhoff C, Hummel KM, Brauer R, Kriegsmann J, Gromnica-Ihle E, Gay RE, and Gay S. Characterization of the cell type-specificity of collagenase 3 mRNA expression compared with membrane type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 61: 391–397, 2002.
 38. Raghov R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, and Kang AH. Transforming growth factor- β increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 79: 1285–1288, 1987.
 39. Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, and Striker GE. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 131: 281–289, 1985.
 40. Schmittgen TD and Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46: 69–81, 2000.
 41. Seeland U, Haeuseler C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfitzner T, Scharfetter-Kochanek K, and Bohm M. Myocardial fibrosis in transforming growth factor- β 1 transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur J Clin Invest* 32: 295–303, 2002.
 42. Selman M, King TE, and Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134: 136–151, 2001.
 43. Selman M, Montano M, Montfort I, and Perez-Tamayo R. A new model of diffuse interstitial pulmonary fibrosis in the rat. *Exp Mol Pathol* 43: 375–387, 1985.
 44. Selman M, Montano 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* 50: 147–166, 1989.
 45. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, and Pardo A. TIMP -1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L562–L574, 2000.
 46. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, and Andoh TF. Angiotensin II blockade decreases TGF- β 1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 52: 660–673, 1997.
 47. Simpson DA, Feeney S, Boyle C, and Stitt AW. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis* 6: 178–183, 2000.
 48. Swiderski RE, Dencoff JE, Floerchinger CS, Shapiro SD, and Hunninghake GW. Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 152: 821–828, 1998.
 49. Tabibzadeh S. Homeostasis of extracellular matrix by TGF- β and lefty. *Front Biosci* 7: d1231–d1246, 2002.
 50. Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 272: L1031–L1045, 1997.
 51. Uhal BD, Joshi I, Hughes W, Ramos C, Pardo A, and Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 275: L1192–L1199, 1998.
 52. Uhal BD, Joshi I, True A, Mundle S, Raza A, Pardo A, and Selman M. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 269: L819–L828, 1995.
 53. Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JM, and Lopez-Otin C. Differential effects of transforming growth factor- β on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 273: 9769–9777, 1998.
 54. Von Schnakenburg C, Strehlau J, Ehrlich JH, and Melk A. Quantitative gene expression of TGF- β 1, IL-10, TNF- α , and Fas ligand in renal cortex and medulla. *Nephrol Dial Transplant* 17: 573–579, 2002.
 55. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, and Uhal B. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 277: L1158–L1164, 1999.
 56. Wells GM, Catlin G, Cossins JA, Mangan M, Ward GA, Miller KM, and Clements JM. Quantitation of matrix metalloproteinases in cultured rat astrocytes using the polymerase chain reaction with a multi-competitor cDNA standard. *Glia* 18: 332–340, 1996.
 57. Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophys* 93: 440–447, 1961.
 58. Woessner JF and Nagase H. *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. New York: Oxford Univ. Press, 2000.
 59. Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizaki M, and Yamanaka N. Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pathol Int* 48: 954–963, 1998.
 60. Yu Q and Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14: 163–176, 2000.

Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis Is Attenuated in γ -Glutamyl Transpeptidase-Deficient Mice

Annie Pardo, Víctor Ruiz, José Luis Arreola, Remedios Ramírez, José Cisneros-Lira, Miguel Gaxiola, Roberto Barrios, Subbarao V. Kala, Michael W. Lieberman, and Moisés Selman

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, México; Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas; and Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan, México DF, México

To investigate repair mechanisms in bleomycin-induced pulmonary fibrosis, we used mice deficient in γ -glutamyl transpeptidase (GGT^{-/-}), a key enzyme in glutathione (GSH) and cysteine metabolism. Seventy-two hours after bleomycin (0.03 U/g), GGT^{-/-} mice displayed a different inflammatory response to wild-type mice as judged by a near absence of neutrophils in lung tissue and bronchoalveolar lavage and a less pronounced rise in matrix metalloproteinase-9. Inflammation in GGT^{-/-} mice consisted mainly of lymphocytes and macrophages. At 1 month, lungs from bleomycin-treated GGT^{-/-} mice exhibited minimal areas of fibrosis compared with wild-type mice (light microscopy fibrosis index: 510 \pm 756 versus 1975 \pm 817, $p < 0.01$). Lung collagen content revealed a significant increase in bleomycin-treated wild-type (15.1 \pm 3.8 versus 8.5 \pm 0.7 μ g hydroxy(OH)-proline/mg dry weight, $p < 0.01$) but not in GGT^{-/-} (10.4 \pm 1.7 versus 8.8 \pm 0.8). Control lungs from GGT^{-/-} showed a significant reduction of cysteine (0.03 \pm 0.005 versus 0.055 \pm 0.001, $p < 0.02$) and GSH levels (1.24 \pm 0.055 versus 1.79 \pm 0.065, $p < 0.002$). These values decreased after 72 hours of bleomycin in both GGT^{-/-} and wild-type but reached their respective control values after 1 month. Supplementation with N-acetyl cysteine partially ameliorated the effects of GGT deficiency. These findings suggest that increased neutrophils and matrix metalloproteinase-9 during the early inflammatory response and adequate thiol reserves are key elements in the fibrotic response after bleomycin-induced pulmonary injury.

Keywords: glutathione; matrix metalloproteinase-9; neutrophils; cysteine

Pulmonary fibrosis, a common final pathway of numerous acute and chronic lung injuries, is characterized by fibroblast proliferation, extracellular matrix accumulation, and distortion of the parenchymal architecture (1). The pathogenic mechanisms underlying the fibrotic response have not been elucidated, but a number of studies have implicated an imbalance between reactive oxygen species and available antioxidant defenses, principally glutathione (GSH) (2–4).

γ -Glutamyl transpeptidase (GGT) is a membrane-bound enzyme that plays an essential role in the metabolism of GSH. Being involved in cellular processes dependent on the oxidation/reduction of GSH, GGT is markedly upregulated in response to a variety of lung oxidant injuries, including nitrogen dioxide, hyperoxia, ozone, and quinones (5–8). Like-

wise, it has been shown that in type 2 epithelial cells, GGT activity is also increased during the inflammatory phase of the bleomycin-induced lung damage in rats (9). On the other hand, although not all of the functions of the γ glutamyl cycle are known, it has been suggested that one of the major functions of GGT is the amino acid supply through glutathione metabolism, especially cysteine (10).

Recently, a GGT-deficient mouse (GGT^{-/-}) was generated (11); these animals appear normal at birth but grow and mature slowly and undergo premature death. The GGT^{-/-} mouse phenotype is characterized by glutathionuria and as a result became cysteine deficient (11, 12). Feeding N-acetylcysteine (NAC) to replace lost GSH normalized growth and reversed most of the pathologic effects observed in GGT^{-/-} mice.

Amino acid availability regulates collagen expression, and it has been recently demonstrated that human lung fibroblasts exposed to amino acid deprivation reduces type I collagen mRNA expression by decreasing both transcription rate and transcript stability (13). Moreover, in the absence or with low concentrations of cysteine, fibroblasts produce undetectable levels of α 1(I) procollagen protein (14). With these ideas in mind, we designed a study to examine the pulmonary response to a fibrogenic insult in GGT-deficient mice with the idea of evaluating the roles of decreased levels of lung GSH and low levels of cysteine in extracellular matrix turnover. We hypothesized that GGT null mice would develop less fibrosis than the wild-type (GGT^{+/+}) mice because cysteine deficiency would impair extracellular matrix synthesis. Some of the results of this study have been previously reported in the form of an abstract (15).

METHODS

Animals

The study was approved by the Ethical Committee at the National Institute of Respiratory Diseases. C57BL/6J129SvEv-GGT-deficient (-/-) mice and wild-type (+/+) littermates 7 to 8 weeks old were used. GGT-deficient mice were generated as previously described (11). Additional detail is provided in the online supplement.

Bleomycin Treatment

Bleomycin (Bristol Laboratories, Syracuse, NY) was administered intratracheally (0.3 U/10 g). Control animals were instilled with saline solution. Mice were killed at 72 hours and 1 month after bleomycin or saline instillation. In parallel experiments, cysteine intake was supplemented with NAC. GGT^{-/-} and GGT^{+/+} mice were instilled with bleomycin, and 2 days after, they were fed with NAC by dissolving it (10 mg/ml) in the drinking water (11). Animals were killed 1 month after bleomycin exposure.

Unless otherwise specified, for every variable analyzed, six to eight control and experimental mice were used.

Semiquantitative Evaluation of Lung Lesions

Lung sections were stained with hematoxylin and eosin and Masson trichrome and were coded and scored blindly for severity and extent

(Received in original form September 6, 2002; accepted in final form November 27, 2002)

Supported in part by National Institutes of Health grant number ES 07,827 (M.W.L.) and by Programa Universitario de Investigación en Salud, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Moisés Selman, M.D., Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, México DF, CP 14080, México. E-mail: mselman@snl.conacyt.mx

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents online at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 167, pp 925–932, 2003

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200209-1007OC on December 4, 2002
Internet address: www.atsjournals.org

of the lesions and percentage of fibrosis as previously described (16). Additional details are provided in the online data supplement. A fibrosis score was determined by multiplying extent of the lesion \times percentage of fibrosis.

Immunohistochemistry

Sections were incubated with antimouse anti-matrix metalloproteinase (MMP)-9 (Chemicon, Temecula, CA) at 4°C overnight. A secondary biotinylated anti-immunoglobulin followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) was used according to manufacturer. 3-Amino-9-ethyl-carbazole (BioGenex) was used as substrate (16). The primary antibody was replaced by nonimmune serum for negative control slides. Additional detail is provided in online supplement.

Bronchoalveolar Lavage

In a parallel experiment, bronchoalveolar lavage (BAL) was performed in control wild-type and GGT^{-/-} mice and after 3 days after 1 month of bleomycin instillation. Lungs were lavaged by flushing with two aliquots of 250 μ L of saline solution. Additional detail is provided in the online supplement. Hematoxylin and eosin stained slides were used for differential cell counting.

Measurement of Hydroxyproline

Lungs were analyzed for collagen content, as described by Woessner (17). Data are expressed as micrograms of hydroxyproline per milligram dry weight. Additional detail is provided in the online supplement.

Lung Tissue and BAL Gelatin Zymography

Lung samples from GGT^{+/+} and GGT^{-/-}, both control subjects, and after 72 hours of bleomycin instillation were homogenized and supernatants containing 5 μ g of protein were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels (8.5%) containing gelatin (1 mg/ml) and a final concentration of 0.3 mg/ml heparin (18). For BAL zymograms, fluid samples containing 5 μ g of protein also from control subjects and 72 hours of bleomycin were used. Additional detail is provided in the online supplement.

GSH and Cysteine Measurements

GSH and cysteine levels of lungs from bleomycin-treated and control mice were determined as described by Kleinman and Richie (19) using HPLC equipped with an electrochemical detector (ESA, Boston, MA). Additional detail is provided in the online supplement.

Statistical Analysis

Values presented here are mean \pm SD. Differences between genetically altered mice and littermates were analyzed by using the Tukey's test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

As previously described (11), GGT-deficient mice grew and gained weight slowly and by 6–8 weeks weighed significantly less than wild-type littermates (13.7 ± 3.7 versus 20.9 ± 2.9 g, respectively).

GSH and Cysteine Determinations

Both cysteine and GSH levels were significantly decreased in the lungs from control saline-instilled GGT-deficient mice in comparison to the control wild-type mice (Table 1). After 72 hours of bleomycin instillation, GSH and cysteine levels were significantly decreased in both wild-type and GGT^{-/-} mice, but levels reached their respective control values at 1 month after bleomycin treatment (Table 1). With the exception of the GSH levels at 72 hours after bleomycin, mutant mice always had values that were significantly lower than their littermates.

Lung Histology and BAL

Normal nontreated lungs from GGT null mice were smaller but did not display any differences compared with normal lungs of

TABLE 1. THIOL LEVELS IN BLEOMYCIN-TREATED AND CONTROL MICE

Treatment	Cysteine	GSH
Wild type	0.055 \pm 0.001 [*]	1.79 \pm 0.065 ^{**}
GGT ^{-/-}	0.030 \pm 0.005 [†]	1.24 \pm 0.055 ^{††}
Wild-type + Bleo 72 h	0.036 \pm 0.001 [†]	0.74 \pm 0.034
GGT ^{-/-} + Bleo 72 h	0.017 \pm 0.002	0.616 \pm 0.030
Wild-type + Bleo 1 mo	0.064 \pm 0.008 [‡]	1.77 \pm 0.039 [‡]
GGT ^{-/-} + Bleo 1 mo	0.030 \pm 0.002	1.38 \pm 0.057

Definition of abbreviations: GGT = γ -glutamyl transpeptidase; GSH = glutathione.

Values presented here are mean \pm SD.

^{*} *p* < 0.02 compared with GGT^{-/-}.

[†] *p* < 0.0003 compared with wild-type plus bleomycin 72 hours.

[‡] *p* < 0.05 compared with GGT^{-/-} plus bleomycin 72 hours.

[‡] *p* < 0.01 compared with GGT^{-/-} plus bleomycin 72 hours.

[‡] *p* < 0.01 compared with GGT^{+/+} plus bleomycin 1 month.

[‡] *p* < 0.002 compared with GGT^{-/-}.

^{**} *p* < 0.0004 compared with wild-type plus bleomycin 72 hours.

^{††} *p* < 0.001 compared with wild-type plus bleomycin 72 hours.

wild-type animals (Figures 1A and 1B). At 3 days after bleomycin instillation, GGT-deficient mice and wild-type mice developed patchy areas of inflammation throughout the lung parenchyma. Figures 1C and 1D illustrate GGT^{-/-} and wild-type mice early response to bleomycin. As shown in Table 2, the severity and extent of the inflammatory response to bleomycin showed no significant differences among GGT^{-/-} and wild-type at 72 hours after instillation. However, the type of inflammatory cell involved was different. At 3 days after instillation, the inflammatory process in the wild-type mice was primarily characterized by accumulation of neutrophils and lymphocytes (Figure 1E). In contrast, inflammation in GGT^{-/-} showed a predominance of lymphocytes and macrophages with few polymorphonuclear cells (Figures 1F and 1G). Similar results were revealed by the cell profile analysis from BAL fluid (Table 3). GGT-deficient mice displayed approximately half of the total cells recovered in BAL compared with the wild type, but in both, a similar percentage of increase was observed after 72 hours and 1 month after bleomycin instillation. The difference in cellularity probably correlates with the GGT-null mouse phenotype, as it also has been reported that they present a 50% reduction in thymus and spleen cellularity (20). However, although an important increase of lymphocytes and neutrophils was observed in the wild-type after 72 hours of bleomycin instillation, GGT^{-/-} exhibited a noteworthy increase of lymphocytes (approximately 40% of the total cells recovered) with a mild increase of neutrophils (Table 3). This divergence cannot be attributed to a difference in circulating leukocytes as similar numbers are found in GGT^{+/+} and GGT^{-/-} per mm³ ($5,498 \pm 1,056$ versus $4,750 \pm 688$, *n* = 5).

At 1 month after bleomycin exposure, the lungs of wild genotype mice showed mostly a mononuclear inflammation with large areas of fibrosis characterized by young connective tissue rich in fibroblasts together with more dense bands of collagen replacing the lung parenchyma, as observed by Masson trichrome staining (Figures 2A and 2C). In contrast, bleomycin-injured GGT-deficient mice showed usually minimal areas of lesion and scarce collagen accumulation (Figures 2B and 2D). The semi-quantitative analysis of the histologic changes revealed a significant decrease in the extent of the lesions in GGT^{-/-} mice compared with wild-type littermate (Table 2). Likewise, the fibrosis score determined multiplying the extent of the lesion by the percent of fibrosis was also significantly reduced in the transgenic mice (510 ± 756 versus $1,975 \pm 817$ from wild-type mice, *p* <

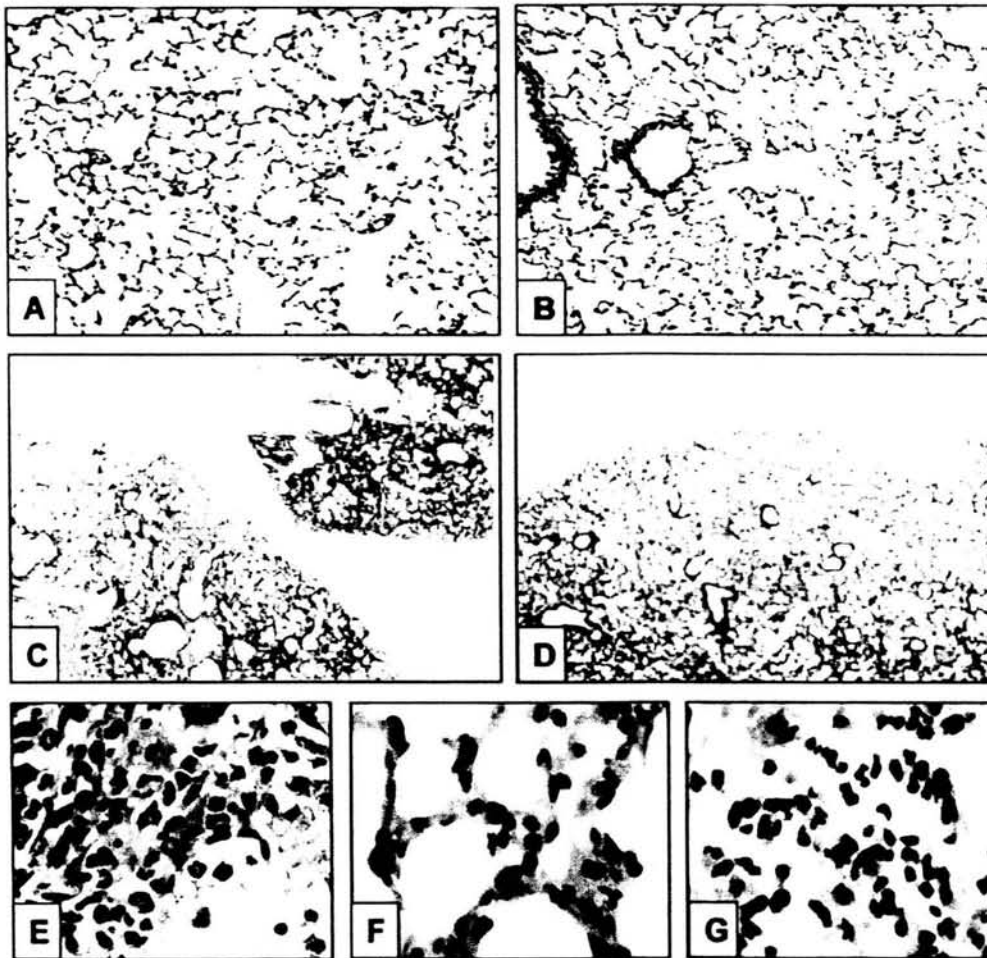


Figure 1. Photomicrographs of tissue sections from normal lungs and 72 hours after bleomycin instillation. (A and B) Wild genotype and GGT-null lungs at baseline (hematoxylin and eosin, original magnification $\times 10$). (C and E) Wild-type mice 72 hours after bleomycin (hematoxylin and eosin, $\times 2.5$ and $\times 40$). (D, F, and G) GGT-deficient mice 72 hours after bleomycin (hematoxylin and eosin, $\times 2.5$ and $\times 40$).

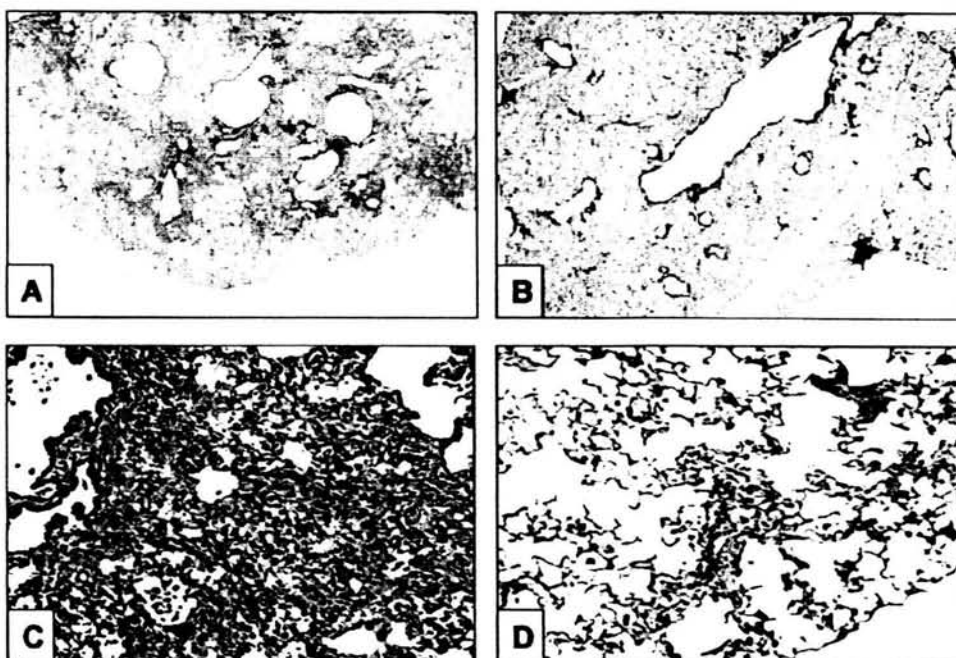


Figure 2. Light micrographs of lung sections from bleomycin-treated mice killed at 1 month. (A and C) Wild-type mice. (B and D) GGT-deficient mice. (A and B) hematoxylin and eosin staining, original magnification $\times 2.5$. (C and D) Masson trichrome staining $\times 10$. The photomicrographs are representative of six to eight animals from each experimental group and were selected to illustrate the extent and pattern of lung fibrosis.

TABLE 2. SEMIQUANTITATIVE ANALYSIS OF THE MORPHOLOGIC CHANGES

	Extent	Severity	Percentage of Fibrosis	Fibrosis Score
Wild-type 72 h	35.7 ± 9.8	1.2 ± 0.4	< 5	
GGT ^{-/-} 72 h	35.0 ± 10.5	1.6 ± 0.5	< 5	
Wild-type 1 mo	43.8 ± 10.6*	2.5 ± 0.5	44.4 ± 11.2 [†]	1,975 ± 817*
GGT ^{-/-} 1 mo	13.3 ± 13.7	1.9 ± 0.7	26.7 ± 18.5	510 ± 756

Definition of abbreviation: GGT = γ -glutamyl transpeptidase.

Values presented here are mean \pm SD.

* $p < 0.01$ compared with GGT^{-/-} 1 month.

[†] $p < 0.05$ compared with GGT^{-/-} 1 month.

0.01). BAL cell profile showed no difference, with macrophages being most of the recovered inflammatory cells (Table 3).

Collagen Content of Normal and Bleomycin-treated Lungs

Lung collagen accumulation was quantified by measuring hydroxyproline content (Figure 3). Lung hydroxyproline in non-injured wild-type and GGT-deficient mice did not show significant differences (8.5 ± 0.7 and 8.8 ± 0.8 μg OH-proline/mg dry weight). At 72 hours after bleomycin instillation, a moderate but significant increase in lung hydroxyproline was noticed in wild-type mice when compared with nonexposed littermates (11.7 ± 1.3 μg OH-proline/mg dry weight, $p < 0.01$). In contrast, no changes were observed in GGT-null mice.

At 1 month after bleomycin exposure, lung hydroxyproline in wild-type mice was further increased as compared with 72-hour or saline-exposed animals (15.1 ± 3.8 μg of OH-proline/mg dry weight; $p < 0.05$ versus 72 hours, and $p < 0.01$ versus saline, respectively). In contrast, GGT-deficient mice showed a marginal but not significant increase of hydroxyproline content when compared with 72-hour or saline-exposed animals (Figure 3).

Zymography of Lung Tissue Extracts and BAL

To analyze gelatinases behavior, lung tissue obtained from wild-type and GGT^{-/-} mice in both control animals and 72-hour bleomycin-treated animals was examined. A lung tissue zymogram showing two representative samples per group is illustrated in Figure 4A. ProMMP-9 band was significantly increased in lung samples from bleomycin-injured wild-type as compared with bleomycin-injured GGT null mice. A twofold increase was revealed by densitometric quantification of the surface and intensity of lysis bands of zymograms derived from five different animals in each group. Likewise, a twofold increase of MMP-9 active form was also observed in wild-type bleomycin-treated mice as compared with GGT-null mice. When samples were treated with aminophenylmercuric-acetate, which promotes processing of proMMPs to lower molecular weight active forms, it

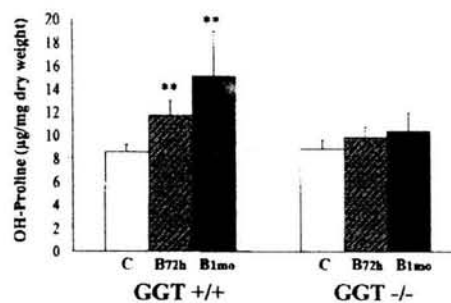


Figure 3. Effect of bleomycin instillation on lung hydroxyproline in wild-type (GGT^{+/+}) and GGT-deficient (GGT^{-/-}) mice at 72 hours and 1 month. ** $p < 0.01$.

became evident that total MMP-9 was higher in bleomycin wild-type compared with GGT^{-/-} mice (data not shown). ProMMP-2 and MMP-2 seemed to be increased in some bleomycin-treated mice mainly in wild-type animals, but no statistical significant differences were found. Lower molecular weight activity bands that could represent MMP-13 because they run at the same level of MMP-13 standard (data not shown) were also increased in bleomycin treated wild-type animals as compared with both control and bleomycin-treated GGT-null mice (Figure 4A). All bands were inhibited when the gels were incubated in the presence of 20 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (data not shown).

BAL fluid samples were also examined by gelatin zymography (Figure 4B). ProMMP-9 was not revealed in BAL from control GGT^{+/+} and GGT^{-/-}. After 72 hours of bleomycin injury, wild-type exhibited an important increase of proMMP-9 and its lower molecular weight active form. In contrast, bleomycin-treated GGT^{-/-} mice displayed a small increase of proMMP-9. By densitometric analysis, an approximately ninefold difference was quantified ($p < 0.01$, $n = 4$; Figure 4B). MMP-9 active form was increased in bleomycin-injured animals both wild-type and GGT^{-/-} mice as compared with respective control subjects. ProMMP-2 activity was increased in both wild-type and GGT^{-/-} as compared with control BAL.

Localization of MMP-9 Immunoreactive Protein in Lung Tissue

The cellular source of MMP-9 was examined by immunohistochemistry on tissue sections from wild-type and GGT^{-/-} control subjects and after 72 hours of bleomycin injury. Positive staining was always more prominent in wild-type bleomycin-injured mice, and a strong signal was observed in numerous macrophages as well as neutrophils and bronchiolar epithelial cells (Figure 5A). In GGT-null bleomycin-treated lungs, MMP-9 was found pri-

TABLE 3. BRONCHOALVEOLAR LAVAGE CELL PROFILE

Experimental Groups	Total Cells ($\times 10^3$)	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils
Wild-type saline	10.4 ± 1.4	9.7 ± 0.56	0.7 ± 0.56	0	0
GGT ^{-/-} saline	5.7 ± 0.9	5.36 ± 0.1	0.3 ± 0.14	0	0.04 ± 0.05
Wild-type bleomycin 72 h	19.7 ± 6.5	10.2 ± 2.3	4.1 ± 3.9	5.3 ± 2.5	0
GGT ^{-/-} bleomycin 72 h	10.1 ± 1.4	5.18 ± 3.5	4.17 ± 3.1	0.67 ± 0.8	0.07 ± 0.1
Wild-type bleomycin 1 mo	38.6 ± 8.3	35.0 ± 3.2	3.3 ± 2.0	0.19 ± 0.3	0.07 ± 0.15
GGT ^{-/-} bleomycin 1 mo	23.5 ± 3.9	20.9 ± 1.6	2.51 ± 1.41	0	0.07 ± 0.14

Definition of abbreviation: GGT = γ -glutamyl transpeptidase.

Values presented here are mean \pm SD.

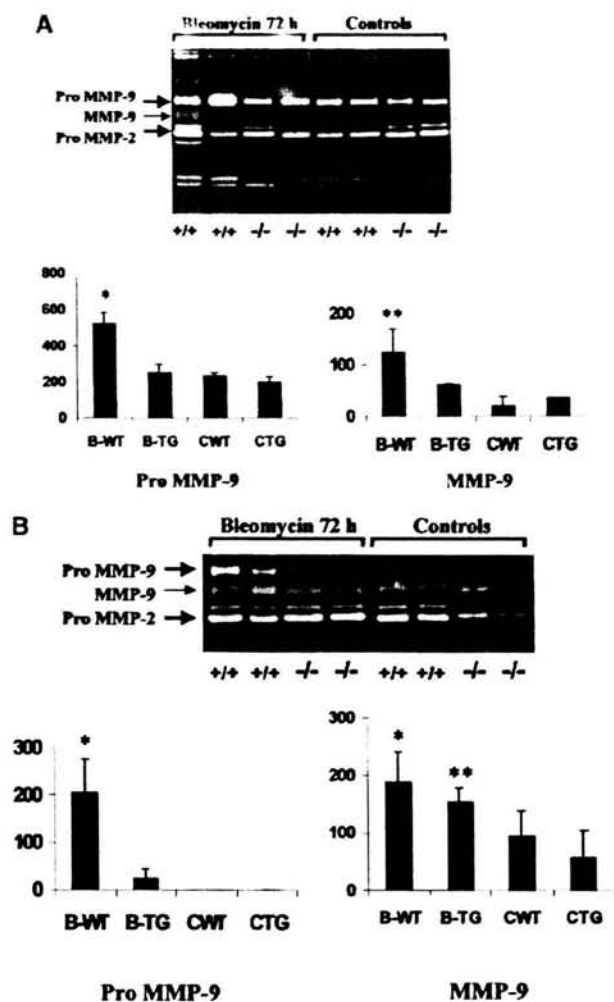


Figure 4. Identification of gelatinolytic activities in lung tissues (A) and BAL fluid (B). Supernatants from lung tissue extracts and BAL fluid derived from bleomycin-instilled wild-type (+/+), GGT-deficient mice (-/-), and control animals were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels (8.5%) containing gelatin (1 mg/ml) and a final concentration of 0.3 mg/ml heparin. Zones of enzymatic activity appear as clear bands over a dark background. Densitometric analysis of four to five animals in each group is shown in the graphics. Results are expressed as activity in arbitrary units. (A) * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$. (B) * $p < 0.001$; ** $p < 0.05$ compared with the control wild type. ** $p < 0.05$ compared with the control GGT-deficient mice. B-TG = Bleomycin, GGT-deficient mice; B-WT = Bleomycin, wild-type mice; CTG = control, GGT-deficient mice; CWT = control, wild-type mice.

marily in scattered alveolar macrophages (Figure 5B). Immunohistochemical staining for MMP-9 was negative in normal lungs of both wild-type and GGT-null mice (Figure 5C). Lung tissue samples incubated with nonimmune sera were also negative (Figure 5D).

NAC Supplementation and Response to Bleomycin

Supplementation of cysteine intake with NAC normalizes the growth curve and partially reverses the phenotype of GGT^{-/-} mice (11). Likewise, NAC supplementation of GGT-deficient mice reverses low GSH levels (21). On the other hand, because it has been claimed that NAC may decrease the lung fibrotic

response in normal rodents (22), we fed wild-type and GGT-null mice with NAC starting 2 days after bleomycin instillation. Thus, GGT^{-/-} mice received bleomycin with their GGT-null phenotype, and after the initial lung damage, they received NAC. Results of this experiment are shown in Table 4. NAC supplementation increased the extent of the lesion in the GGT^{-/-} mice, but the fibrotic index was still significantly lower 1 month after bleomycin than the wild-type plus NAC.

Regarding collagen content, bleomycin injury in NAC-treated GGT^{-/-} mice provoked a significant increase of lung hydroxyproline as compared with control saline-treated mice (11.8 ± 1.4 versus 8.8 ± 0.8 , $p < 0.01$). However, lung hydroxyproline was still significantly lower in NAC-treated GGT^{-/-} mice compared with NAC-treated wild type (Table 4).

DISCUSSION

In this study, we compared the initial inflammatory and late fibrotic responses to bleomycin in GGT-deficient mice and wild-type littermates. Bleomycin administration to wild-type mice caused an initial pneumonitis that evolved to fibrosis. In contrast, GGT^{-/-} developed a similar early inflammatory response as measured by severity and extent but appeared to be largely protected from the late fibrotic effects of bleomycin.

Interestingly, the type of inflammatory cells observed at 72 hours after bleomycin instillation exhibited important differences. Thus, although in the wild-type mice there was a neutrophilic/lymphocytic inflammatory response, GGT-deficient mice displayed a predominantly mononuclear cell reaction with few polymorphonuclear cells. The early alveolitis noticed in wild-type mice is similar to that reported in this and other species where a remarkable infiltration of neutrophils characterizes the initial inflammatory response to bleomycin (23–25).

A prominent finding of this work was the demonstration that GGT-deficient mice develop a markedly lesser fibrotic response than the wild-type mice after 1 month bleomycin-induced lung injury. Thus, lung morphology in GGT^{-/-} mice showed only few small lesions with reduced collagen staining, and lung hydroxyproline content was similar to GGT-deficient nontreated mice.

An oxidant/antioxidant imbalance has been proposed as a pathogenic mechanism contributing to lung damage and inflammation in patients with pulmonary fibrosis. In this context and at least theoretically, GSH deficiency might enhance bleomycin-induced fibrosis, as this molecule is the most important extracellular antioxidant in the lung. In fact, there is evidence suggesting that an increased oxidant burden and a deficiency of GSH may play a role in the pathogenesis of fibrosing alveolitis (2–4). Moreover, there are several findings supporting that GSH can directly affect inflammation by inhibiting the production or function of several inflammatory cytokines and chemokines, such as tumor necrosis factor- α , monocyte chemoattractant protein-1, and some chemokine receptors (26–28). In addition, the lack of GGT impairs the mouse immune system affecting the immune responsiveness, suggesting an important immunoregulatory role for GSH (20). Likewise, the use of exogenous antioxidants attenuates the severity of the fibrosis and suppressed the increases in lymphocyte and neutrophil counts, in bleomycin-induced lung injury (29). Thus, according to these studies, it would be expected that GGT-deficient mice, in opposite to our findings, would develop a more aggressive fibrosis.

Three different mechanisms may at least partially explain this paradox. In part, the reduced fibrotic response of the GGT^{-/-} mice might be related to the differences noticed in the early inflammatory response. As mentioned, wild-type mice displayed a neutrophilic reaction and showed more fibrosis. It has been suggested that persistence of neutrophils may enhance lung fi-

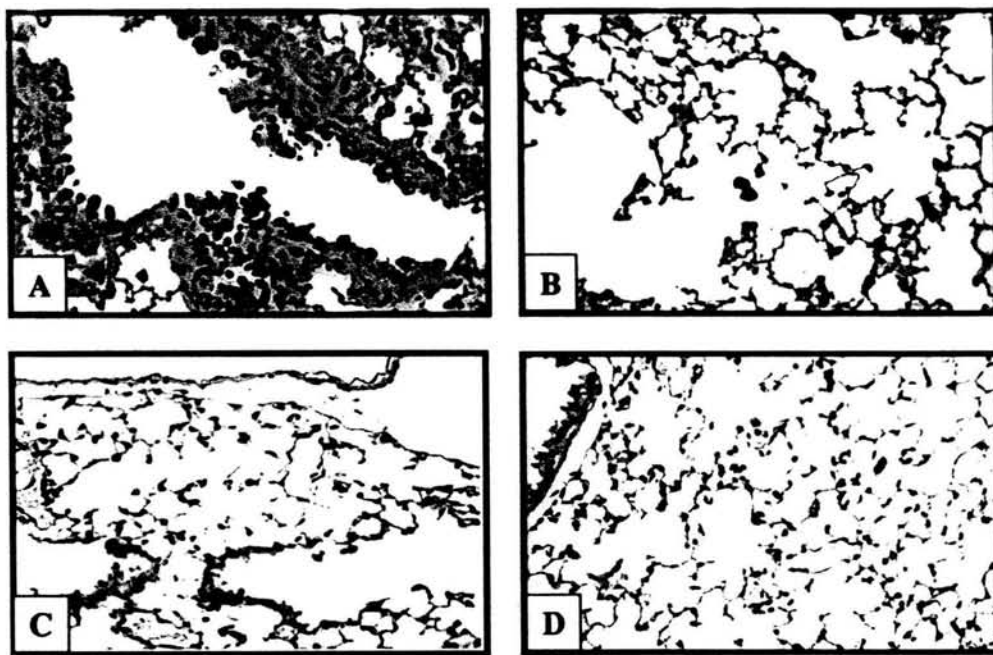


Figure 5. Localization of MMP-9 in wild-type and GGT^{-/-} lung samples. Immunoreactive MMP-9 was revealed by 3,3'-diaminobenzidine. (A) Numerous MMP-9 staining cells are noticed in wild-type lung (40 \times). (B) An area of positive stained alveolar macrophages in GGT^{-/-} lung (40 \times). (C) Wild-type control lung. No reactivity was observed in normal lungs of both wild-type and GGT^{-/-}. (D) Negative control section from a GGT^{-/-} in which the primary antibody was omitted. Samples were counterstained with hematoxylin.

brosis to a number of injuries. Thus, in experimental lung fibrosis induced by silica or bleomycin, the increase of neutrophils and duration of tissue neutrophil activation has been correlated with chronic alveolitis progressing to fibrosis (30).

Likewise, an increase of BAL neutrophils has been found in a number of interstitial lung diseases that result in fibrosis (31, 32). Furthermore, neutrophil migration and activation are usually higher in patients with more aggressive and worse prognosis fibrotic lung disorder (33), and increased tissue neutrophils loaded with MMP-9 and collagenase-2 are implicated in the fibrotic reaction of patients with chronic hypersensitivity pneumonitis (15).

Another potential fibrogenic mechanism that may also contribute to the different fibrotic response found in this study is related with the participation of MMPs. Particularly, an increased lung expression of MMP-9 has been demonstrated in experimental and human pulmonary fibrosis (15, 17, 34, 35). Excessive MMP-9 activity may contribute to the loss of integrity of the basement membranes and subsequently plays a fibrogenic role. Thus, in bleomycin-induced lung fibrosis, a coincidental increase of MMP-9 activity and disruption of the alveolar epithelial basement membrane has been documented (36). On the other hand, cell surface-localized MMP-9 proteolytically cleaves latent

transforming growth factor- β , a prototype of profibrotic growth factor, providing a potentially important mechanism for transforming growth factor- β activation and tissue remodeling (37).

The possible role of MMP-9 in lung fibrogenesis is further supported by experiments performed in MMP-9-deficient mice that develop lesser fibrotic lesions compared with MMP-9^{+/+} littermates when exposed to bleomycin (38). Also, transgenic mice overexpressing interleukin-13 develop pulmonary fibrosis associated with MMP-9 upregulation and transforming growth factor- β activation (39). Furthermore, in BAL fluid samples from rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis, a noteworthy increase of neutrophil-derived MMP-9 activity has been characteristically detected (40).

In this context, our findings of a different MMP-9 expression in both BAL and lung tissues of wild-type compared with GGT^{-/-} mice support a possible role for this enzyme. GGT-deficient mice displayed a lower MMP-9 expression after injury and subsequently a slighter fibrosis than wild type.

Additionally, reduced lung MMP-9 activity in GGT^{-/-} mice can be related to the lesser neutrophilic response, as these cells are a major source of this enzyme. In this context, it has been shown that inhibition of LPS-induced airway neutrophilic infil-

TABLE 4. LUNG RESPONSE TO N-ACETYLCYSTEINE ADMINISTRATION

Bleomycin 1 Month	Extent of the Lesion	Percentage of Fibrosis	Fibrosis Score	Lung Hydroxyproline
Wild-type	43.8 \pm 10.6	44.4 \pm 11.2	1975 \pm 817	15.1 \pm 3.8
GGT ^{-/-}	13.3 \pm 10.6	26.7 \pm 18.5	510 \pm 756	10.4 \pm 1.6
Wild-type plus NAC	40.0 \pm 21.6	45.0 \pm 12.9	2,000 \pm 1,397 [†]	13.7 \pm 0.8 [‡]
GGT ^{-/-} plus NAC	25.0 \pm 10.0*	22.0 \pm 11	600 \pm 561	11.8 \pm 1.4 [‡]

Definition of abbreviations: GGT = γ -glutamyl transpeptidase; NAC = N-acetylcysteine.

Values presented here are mean \pm SD.

* $p < 0.05$ compared with GGT^{-/-}.

[†] $p < 0.05$ compared with GGT^{-/-} 1 month plus NAC.

[‡] $p < 0.05$ compared with GGT^{-/-} 1 month plus NAC.

[§] $p < 0.01$ compared with levels obtained in saline-treated GGT^{-/-} (8.8 \pm 0.8, μ g OH-proline/mg dry weight; see Figure 3).

tration in the guinea pig reduced MMP-9 activity recovered from inflamed guinea pig airways (41).

A third mechanism to consider for explaining the lower lung fibrotic response in GGT^{-/-} mice is related to the role of this enzyme in cysteine homeostasis. GGT catalyzes the first step in the extracellular hydrolysis of GSH and plays a critical role in GSH recycling. GSH is synthesized *de novo* from an intracellular pool of glutamine, glycine, and cysteine and is degraded extracellularly in a two step process catalyzed by GGT and a dipeptidase. As a result of this γ -glutamyl cycle, GSH can be degraded and its constituent amino acids reused. In this context, in normal conditions the extracellular space contain an available pool of cysteine that is the delimiting substrate for GSH biosynthesis.

Actually, results obtained in GGT-null mice support the notion that the cleavage of GSH is a major source of circulating cysteine (11). Without this source of reutilization of cysteine, normal dietary intake is insufficient to compensate its loss as GSH. Supporting this point of view, we found markedly decreased levels of lung cysteine in GGT^{-/-} mice either with saline instillation (control subjects) or after bleomycin exposure. In addition, the increase of the fibrotic lung response after NAC supplementation in GGT-deficient mice supports this notion. GGT-null mice receiving NAC augmented hydroxyproline content after bleomycin injury compared with their nontreated littermates, although continued being lower than the wild-type mice as the fibrotic index did.

A lack of cysteine may have a profound effect on extracellular matrix turnover. There is evidence demonstrating that amino acid deprivation markedly decreases newly synthesized type I collagen by human lung fibroblasts, probably by intracellular degradation of improperly folded molecules (14). Moreover, this effect was shown to be specific for collagen as fibronectin levels, and total protein levels were not affected. In addition, it has been shown that depletion of amino acids also decreases $\alpha 1(I)$ collagen mRNA levels and repletion of amino acids induces a rapid re-expression of $\alpha 1(I)$ mRNA. More importantly, this effect seems to be critically dependent on cysteine but not on other amino acids (42).

Cysteine deficiency may also affect cysteine-rich proteins implicated in connective tissue remodeling. For example, it has been shown that SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine)-null mice exhibited attenuated collagen accumulation after bleomycin injury (43). SPARC is a unique matricellular glycoprotein that has been implicated as playing an important role in tissue repair (44). SPARC is coexpressed with type I collagen, and it has been associated with tissues undergoing extracellular matrix remodeling and fibrosis (45, 46). Likewise, decreased cysteine may limit synthesis of cysteinyl leukotrienes, which may also contribute to the protection from lung fibrosis, as it has been recently demonstrated in the leukotriene-deficient mice (47).

In conclusion, our results demonstrated that GGT^{-/-} mice develop a markedly decreased fibrotic response after bleomycin injury. This finding was related to a lower neutrophilic alveolitis and MMP-9 expression, and a deficiency of lung cysteine, suggesting potential mechanisms for lung structural remodeling after a fibrogenic insult.

References

- Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 1990; 259:L159-L184.
- Cantin AM, Hubbard RC, Crystal RG. GSH deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:370-372.
- Teramoto S, Fukuchi Y, Uejima Y, Shu CY, Orimo H. Superoxide anion formation and GSH metabolism of blood in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Mol Med* 1995;55:66-70.
- Behr J, Degenkolb B, Maier K, Braun B, Beinert T, Krombach F, Vogelmeier C, Fruhmann G. Increased oxidation of extracellular GSH by bronchoalveolar inflammatory cells in diffuse fibrosing alveolitis. *Eur Respir J* 1995;8:1286-1292.
- Takahashi Y, Oakes SM, Williams MC, Takahashi S, Miura T, Joyce-Brady M. Nitrogen dioxide exposure activates γ -glutamyl transferase gene expression in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;143:388-396.
- Van Klaveren RJ, Dinsdale D, Pype JL, Demedts M, Nemery B. Changes in γ -glutamyltransferase activity in rat lung tissue, BAL, and type II cells after hyperoxia. *Am J Physiol* 1997;273:L537-L547.
- Takahashi Y, Takahashi S, Yoshimi T, Miura T, Mochitate K, Kobayashi T. Increases in the mRNA levels of γ -glutamyltransferase and heme oxygenase-1 in the rat lung after ozone exposure. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1061-1064.
- Liu RM, Shi MM, Giulivi C, Forman HJ. Quinones increase γ -glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:L330-L336.
- Karam H, Hurbain-Kosmath I, Housset B. Antioxidant activity in alveolar epithelial type 2 cells of rats during the development of bleomycin injury. *Cell Biol Toxicol* 1998;14:13-22.
- Hanigan MH, Rickett WA. Extracellular GSH is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 1993; 32:6302-6306.
- Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, Carter BZ, Barrios R, Ou CN, Chevez-Barrios P, Wang Y, Habib GM, Goodman JC, et al. Growth retardation and cysteine deficiency in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7923-7926.
- Harding CO, Williams P, Wagner E, Chang DS, Wild K, Colwell RE, Wolff JA. Mice with genetic γ -glutamyl transpeptidase deficiency exhibit glutathionuria, severe growth failure, reduced life spans, and infertility. *J Biol Chem* 1997;272:12560-12567.
- Krupsky M, Kuang PP, Goldstein RH. Regulation of type I collagen mRNA by amino acid deprivation in human lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1997;272:13864-13868.
- Rishikof DC, Ricupero DA, Poliks CF, Goldstein RH. Amino acid availability regulates type I procollagen accumulation in human lung fibroblasts. *J Cell Biochem* 1999;75:130-137.
- Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Montaño M, Ramírez R, Gaxiola M, Barrios R, Lieberman MW, Selman M. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is decreased in gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) knockout mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A711.
- Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura-Valdez L, Carrillo G, Estrada A, Mejía M, 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.
- Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961;93:440-447.
- Yu W, Woessner F Jr. Heparin-enhanced zymographic detection of matrix metalloproteinases and collagenases. *Anal Biochem* 2001;293:38-42.
- Kleinman WA, Richie JP. Determination of thiols and disulfides using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995;672:73-80.
- Lawrence BP, Will Y, Reed DJ, Kerkvliet NI. Gamma-glutamyltranspeptidase knockout mice as a model for understanding the consequences of diminished glutathione on T cell-dependent immune responses. *Eur J Immunol* 2000;30:1902-1910.
- Barrios R, Shi ZZ, Kala SV, Wiseman AL, Welty SE, Kala G, Bahler AA, Ou CN, Lieberman MW. Oxygen-induced pulmonary injury in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Lung* 2001;179:319-330.
- Hagiwara SI, Ishii Y, Kitamura S. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:225-231.
- Smith RE, Strieter RM, Phan SH, Lukacs NW, Huffnagle GB, Wilke CA, Burdick MD, Lincoln P, Evanoff H, Kunkel SL. Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 α in bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* 1994;153:4704-4712.
- Thrall RS, Barton RW, D'Amato DA, Sulavik SB. Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:488-492.
- Mitsuhashi H, Asano S, Nonaka T, Hamamura I, Masuda KI, Kiyoki M. Administration of truncated secretory leukoprotease inhibitor ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:369-374.
- Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. N-acetylcysteine and glutathione as

- inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 1992; 140:390-399.
2. Desai A, Huang X, Warren JS. In: acellular glutathione redox status modulates MCP-1 expression in pulmonary granulomatous vasculitis. *Lab Invest* 1999;79:837-847.
 28. Saccani A, Saccani S, Orlando S, Sironi M, Bernasconi S, Ghezzi P, Mantovani A, Sica A. Redox regulation of chemokine receptor expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2761-2766.
 29. Tamagawa K, Taooka Y, Maeda A, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M. Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1279-1284.
 30. Jones HA, Schofield JB, Krausz T, Boobis AR, Haslett C. Pulmonary fibrosis correlates with the duration of tissue neutrophil activation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:620-628.
 31. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VS, Crystal RG. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation of bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 1979;97: 149-206.
 32. Crystal RG, Gadek JE, Ferrans VS, Fulmer JD, Line BR, Hunninghake GW. Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am J Med* 1981;70:542-568.
 33. Cailles JB, O'Connor C, Pantelidis P, Southcott AM, Fitzgerald MX, Black CM, du Bois RM. Neutrophil activation in fibrosing alveolitis: a comparison of lone cryptogenic fibrosing alveolitis and systemic sclerosis. *Eur Respir J* 1996;9:992-999.
 34. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios B, Pardo A. TIMP 1, 2, 3, and 4 in idiopathic pulmonary fibrosis: a prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol* 2000;279: L562-L574.
 35. Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 1998;78: 687-698.
 36. Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizaki M, Yamanaka N. Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pathol Int* 1998;48:954-963.
 37. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-3 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14:163-176.
 38. Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks WC, Shipley JM, Senior RM. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 2000;157:525-535.
 39. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliensky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta (1). *J Exp Med* 2001;194:809-822.
 40. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaie T, Ando M. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1949-1956.
 41. Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, Webb EF, Rieman DJ, Lee JC, Romanic AM, Adams JL, Hay DW, Griswold DE. SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am J Physiol* 2000;279:L895-L902.
 42. Rishikof DC, Kuang PP, Poliks CF, Goldstein RH. Regulation of type I collagen mRNA in lung fibroblasts by cysteine availability. *Biochem J* 1998;331:417-422.
 43. Strandjord TP, Madtes DK, Weiss DJ, Sage EH. Collagen accumulation is decreased in SPARC-null mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 1999;277:L628-L635.
 44. Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1495-1506.
 45. Frizzell E, Liu SL, Abraham A, Ozaki I, Eghbali M, Sage EH, Zern MA. Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatology* 1995;21:847-854.
 46. Pichler RH, Hugo C, Shankland SJ, Reed MJ, Bassuk JA, Andoh TF, Lombardi DM, Schwartz SM, Bennett WM, Alpers CE, et al. SPARC is expressed in renal interstitial fibrosis and in renal vascular injury. *Kidney Int* 1996;50:1978-1989.
 47. Peters-Golden M, Bailie M, Marshall T, Wilke C, Phan SH, Toews GB, Moore BB. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:229-235.