



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“PAPEL DE LA MMP-1 EN LA MIGRACIÓN
DE CÉLULAS EPITELIO ALVEOLARES”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ILIANA HERRERA FUENTES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2007



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.

Agradezco a las siguientes instituciones el apoyo brindado para la realización de esta tesis de Maestría:

Especialmente al Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) por darme la oportunidad de pertenecer a un grupo de profesionistas reconocidos a nivel mundial.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el presupuesto brindado del macroproyecto: SDI.PTID.05.6.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento del proyecto 41043-M y por la beca otorgada (No. de registro 189782) para la realización de esta tesis.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por la aportación de reactivos y material biológico.

Un reconocimiento muy especial a mi comité tutorial:

A la Dra. Annie Pardo de quien tanto he aprendido y me ha hecho cómplice de sus conocimientos.

Al Dr. Moisés Selman Lama por su apoyo intelectual y personal.

A la Dra. Lourdes Segura Valdéz por sus consejos, su tiempo y su entereza para la realización de este proyecto.

A los grandes amores de mi vida

Agustín Herrera Mtz. e Irma Fuentes A.

Por brindarme la vida, por su abnegación en todo momento,

*Por su prototipo de superación perseverante, por su juicio y
confidencia,*

*Por su amor y cariño incondicional, porque sin ustedes no hubiera
llegado al final de mi posgrado.*

Por todo esto y más.....

¡GRACIAS!

A mis hermanas ISSY, LIZ Y VERO

*por su incondicionalidad a
cada momento.*

AGRADECIMIENTOS

A mi respetable Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación profesional durante mi posgrado.

A Lolita y Alejandro por su paciencia compartida a lo largo de toda mi estancia en la Maestría.

A la Dra. Vilma Maldonado, por su apoyo incondicional y por compartir sus conocimientos para la realización de mi tesis.

Al Dr. Carlos Ramos, Dra. Martha Montaña, M. en C. Karina Becerril, Dr. Víctor Ruíz, M. en C. Ignacio Páramo, Biól. Rafael Reynoso que me aconsejaron generosamente sin ningún interés de por medio y me brindaron su tiempo cuando lo necesité.

Al Dr. José Cisneros por compartirme sus conocimientos, por sus exhortaciones para seguirme superando, por su tiempo, su cordialidad, su paciencia, su cariño y su respeto, pero sobre todo por seguir siendo mi motivo.

A mis amigos(as) del alma: Abraham, Maricela, Maribel, Diana, Elisa, Talina, Paty y especialmente a la mejor persona que alguien puede tener como amigo, Marco Antonio Checa, una vez más, gracias Cori.

A mis tíos (as), primos y mi pekeña Fanny por su motivación y entusiasmo de toda la vida.

Gracias Vidauri..... por todo lo que hemos compartido y por tu apoyo a cada momento.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
SUMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
Fibrosis pulmonar.....	5
Epitelio Alveolar y Matriz Extracelular.....	8
Metaloproteasas de Matriz Extracelular.....	10
Metaloproteasas en la Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	18
MMP-1 en la Fibrosis pulmonar Idiopática.....	18
OBJETIVO	22
HIPÓTESIS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	22
Línea celular epitelial MLE-12.....	22
Cultivo de células.....	22
Bacterias competentes.....	23
Extracción y purificación del plásmido.....	24
Plásmidos pSP64 y pQCXIP.....	25
Reacción de ligación pQCXIP/MMP-1.....	25
Transformación.....	26
Análisis de las clonas.....	27
Transfección celular.....	27
Extracción de RNA.....	28

RT-PCR.....	29
Western Blot.....	30
Ensayo de reparación de una herida <i>in vitro</i>	31
Ensayo de migración en cámara Boyden.....	32
Ensayo de proliferación de células epitelio alveolares tipo II.....	33
Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS.....	34
Expresión de la MMP-1 en células epiteliales tipo II MLE-12.....	34
Análisis de la MMP-1 por Western Blot.....	35
Papel de la MMP-1 en la reparación de una herida.....	36
Efecto del EGF en la reparación de una herida <i>in vitro</i>	37
Ensayo de migración en cámara tipo Boyden.....	41
Proliferación de células epiteliales MLE-12.....	41
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	44
REFERENCIAS.....	49

RESUMEN

La fibrosis pulmonar es el resultado final de varios padecimientos respiratorios de etiología conocida o desconocida agrupados bajo el término de enfermedades intersticiales pulmonares. Se caracterizan por la destrucción de las unidades alveolo-capilares, que son responsables del intercambio gaseoso, resultando como consecuencia insuficiencia respiratoria progresiva. Dentro de este grupo de padecimientos, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es de etiología desconocida y se caracteriza por micro daños y activación de células epiteliales alveolares seguida por la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y acumulación excesiva de matriz extracelular en el parénquima pulmonar. Los mecanismos patogénicos responsables de este tipo de respuesta fibrosante irreversible no se entienden con precisión pero se ha hipotetizado que existe una alteración en el balance normal de la homeostasis de las colágenas fibrilares y un desequilibrio en la expresión de algunas metaloproteasas de matriz (MMPs). En estudios previos hemos demostrado que la MMP-1 está altamente expresada en FPI y se localiza fundamentalmente en células del epitelio alveolar aunque se desconoce el papel que desempeña. El objetivo de éste trabajo fue analizar si la presencia de la MMP-1 en células epiteliales alveolares influye en la migración y proliferación de este tipo celular. Con este propósito, se transfectaron células de ratón MLE-12 que carecen de esta enzima con la MMP-1 humana y se analizó la migración celular a través de un ensayo *in vitro* de reparación de herida tanto en condiciones basales como en presencia del factor epidermal de crecimiento (EGF) y a través de un ensayo de migración en cámaras tipo Boyden recubierta con colágena tipo I y utilizando el EGF como quimio-atrayente. Así mismo, con el fin de determinar el

efecto de la MMP-1 en la división celular, se llevó a cabo un ensayo de proliferación. Los resultados obtenidos del análisis por PCR mostraron un fragmento de aproximadamente 172 pb, correspondiente a la MMP-1 en las células que fueron transfectadas. El ensayo de herida *in vitro*, mostró que a las 48 horas, las células transfectadas con la MMP-1 cubren 70% más de la superficie que aquellas que no fueron transfectadas. Así mismo, se observó que este fenómeno se incrementó cuando se adicionó el EGF cerrando por completo la herida al término de 36 horas, mientras que las células sin MMP-1 no lograron cerrar la herida. Así mismo, se observó el mismo comportamiento cuando se analizó la migración celular en las cámaras Boyden, nuestros resultados mostraron que bajo estas condiciones, las células transfectadas con MMP-1 migran en mayor proporción que aquellas que no tienen el inserto. Adicionalmente se observó que a las 36 y 48 horas de cultivo con y sin EGF, las células que expresan la MMP-1 proliferan más (16%) que aquellas que no tienen la enzima. Estos resultados sugieren que la MMP-1 podría desempeñar un papel importante en el proceso de re-epitelización en la FPI a través de la migración y la proliferación del epitelio alveolar.

SUMMARY

Pulmonary fibrosis is the final result of different respiratory ailments of known or unknown etiology that are grouped under the term Interstitial Pulmonary Diseases. They are characterized by the destruction of alveolo-capillary units which are responsible for gas exchange, resulting in progressive respiratory insufficiency. In this group of diseases Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is of unknown etiology and is characterized by micro damage and the activation of alveolar epithelial cells which is followed by the formation of fibroblast/myofibroblast foci and the excessive accumulation of extracellular matrix in the lung parenchyma. The pathogenic mechanisms that lead to this type of irreversible fibrosing response are not well understood. It has been hypothesized That there exists an alteration in the normal balance of homeostasis of the fibrillar collagens and a disequilibrium in the expression of some matrix metalloproteinases (MMPs). In previous studies it has been demonstrated that MMP-1 is highly expressed in IPF and is located inalveolar epithelial cells, though it is not known what role it plays. The objective of this work was to analyze if the presence of MMP-1 in alveolar epithelial cells influences the migration and proliferation of this cell type. With this objective, MMP-1 lacking mouse MLE-12 cells were transfected with human MMP-1, and the migration of cells was analyzed through an *in vitro* wound repair assay, both in basal conditions and in the presence of epidermal growth factor (EGF) and with a migration assay in Boyden chambers covered with type I collagen and using EGF as a chemoattractant . Also, with the purpose of determining if the effect of MMP-1 in wound repair is only due to the increase of cell migration by the influence of this enzyme and not because of cell proliferation, a cell proliferation assay was carried

out. The results obtained in the analysis by PCR showed a fragment of approximately 172 bp belonging to the MMP-1 from the cells that were transfected. The *in vitro* wound repair assay showed that after 48 hours the MMP-1 transfected cells cover 70% more surface than the cells that were not transfected. When EGF was added to the medium, the MMP-1 transfected cells were capable of completely covering the surface in 36 hours, while cells lacking MMP-1 were incapable of closing the wound even after 48 hours. The same behavior was observed in the Boyden chambers, our results show that under these conditions the MMP-1 transfected cells migrate in a greater proportion than those without the insert. Additionally, it was observed that after 36 and 48 hours of culture with or without EGF the cells that express MMP-1 proliferate more (16%) than those that do not have the enzyme. These results suggest that the expression of MMP-1 might play an important role during the process of re-epithelization in IPF through migration and proliferation of the alveolar epithelium.

INTRODUCCIÓN

Fibrosis pulmonar.

La fibrosis pulmonar es el resultado final de varios padecimientos respiratorios de etiología conocida o desconocida agrupados bajo el término de enfermedades intersticiales pulmonares, que se caracterizan por la destrucción de las unidades alveolo-capilares responsables del intercambio gaseoso, resultando como consecuencia la aparición de insuficiencia respiratoria progresiva. Dentro de este grupo de padecimientos, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es de etiología desconocida y representa la forma más común y agresiva de estas enfermedades (1, 2).

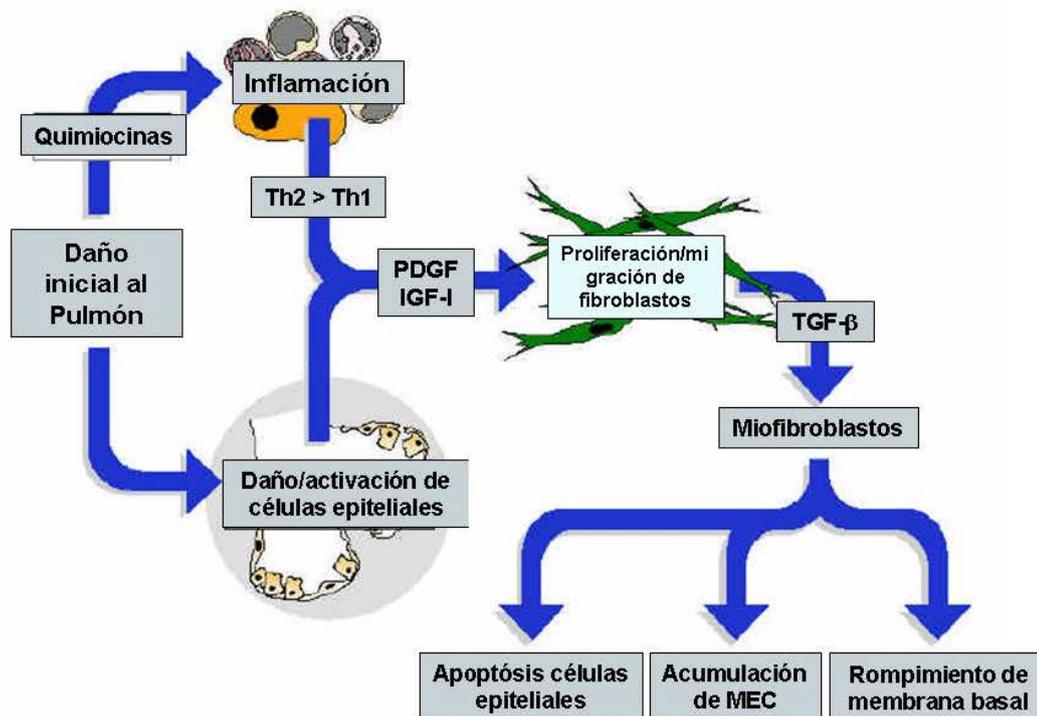
Se han propuesto dos vías para el desarrollo de la fibrosis pulmonar, la vía inflamatoria y la vía epitelial (1,2). La inflamatoria es la hipótesis clásica para explicar las enfermedades intersticiales pulmonares, que se distinguen por presentar una fase temprana de alveolitis ó inflamación y como punto final una fase fibrótica. En este contexto se ha propuesto que un daño en el epitelio alveolar y/o el endotelio vascular desencadenan una respuesta inflamatoria provocando la perturbación del intersticio y los espacios alveolares. Esta respuesta persiste hasta dar lugar a una fase caracterizada por la proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y el depósito de MEC en el intersticio pulmonar. Una vez que se ha presentado un daño en los epitelios se desencadena una liberación de moléculas quimioatrayentes como MIP-1 α , MCP-1 y IL-8 y moléculas de adhesión, que al mismo tiempo provocan el reclutamiento de células inflamatorias, tales como macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos. Así mismo, las células inflamatorias, factores de crecimiento y diversa citocinas que tienen como blanco

células residentes del pulmón favorecerían una respuesta inflamatoria prolongada que desencadenaría un proceso fibrótico (2,3).

Aún cuando este mecanismo es característico de la mayoría de las enfermedades intersticiales que llevan a la fibrosis, nuestro grupo de trabajo ha propuesto que en la FPI el componente inflamatorio parece no determinar el curso de la enfermedad y que microdaños secuenciales a las células del epitelio alveolar seguidos por una interacción anormal del epitelio-mesénquima son responsables de la fibrosis en la FPI (2,4,5).

Esta vía llamada la vía epitelial, propone que un daño en el epitelio alveolar desencadena la síntesis de citocinas y factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) entre otros, involucrados en la migración y proliferación de fibroblastos, así como, en la inducción del cambio de fenotipo a miofibroblastos (1). La activación de células epiteliales seguida por la formación de focos de fibroblastos se encuentran localizados en sitios adyacentes al epitelio dañado, en los cuales el resultado final es la acumulación exagerada de proteínas de matriz extracelular (MEC) en el parénquima pulmonar, principalmente de colágenas tipos I y III (2,5). La característica que mejor representa a la FPI es la presencia de células epitelio alveolares tipo II hiperplásticas e hipertróficas, con un citoplasma abundante, un núcleo hipercromático grande y un nucleolo prominente, también conocido como cuboidalización del epitelio alveolar. También se pueden presentar fenotipos morfológicos en donde las células epiteliales se muestran elongadas, aplastadas y atenuadas, éstas células usualmente tienden a cubrir los focos fibroblásticos.

Las causas y el significado de todos los cambios epiteliales se desconocen, sin embargo algunos de ellos están relacionados con el daño inicial, mientras que otros son la consecuencia de una acelerada proliferación y migración de células epiteliales; lo cual sería un indicio de regeneración epitelial posterior a un daño (6). En adición a la proliferación, la migración de células epitelio alveolares y bronquiolares también puede dañar la respuesta regenerativa, de cualquier modo el papel de la migración en una re-epitelización inadecuada así como el mecanismo principal implicado en este proceso no ha sido elucidado. Sin embargo es importante enfatizar que las células epiteliales de la superficie alveolar que provienen de un microambiente fibrótico pueden contribuir a la fibrogénesis no sólo porque sobre expresen citocinas profibróticas, sino también porque pueden ser incapaces de secretar algunos inhibidores para el crecimiento de los fibroblastos (1).



Esquema 1. Vía inflamatoria y epitelial de la fibrosis pulmonar idiopática.

Epitelio alveolar y matriz extracelular .

En el pulmón normal, la barrera alveolar está compuesta de tres diferentes estructuras: 1) endotelio capilar, 2) el espacio intersticial incluyendo la membrana basal y la matriz extracelular y 3) el epitelio alveolar. El 90% del alveolo está cubierto por células morfológicamente escamosas y alargadas, conocidas como células alveolares tipo I, éstas se caracterizan por favorecer el intercambio gaseoso, son extremadamente pequeñas y son muy susceptibles a un daño, por lo que en una agresión al pulmón, las células alveolares tipo I tienden a morir primero mientras que las células tipo II pueden proliferar para reparar la membrana basal que ha quedado desnuda o deteriorada (7,8).

Por su parte, las células alveolares tipo II se caracterizan por ser multifuncionales y de morfología cuboidal, comprenden cerca del 15% del epitelio alveolar y se

encargan de sintetizar, almacenar, secretar y reciclar el surfactante pulmonar. Otra de las funciones que caracterizan a las células alveolares tipo II, es que sirven como células progenitoras a las células alveolares tipo I, particularmente durante la re-epitelización del alveolo después de un daño pulmonar; transportan el sodio del fluido alveolar hacia el intersticio, y secretan una gran variedad de factores de crecimiento y citocinas, antes mencionados (8,9).

Como se señaló anteriormente, el papel del epitelio alveolar en el desarrollo y progresión de la fibrosis ha sido ampliamente sustentado (4-7). Interesantemente, las células alveolares tipo II que han sufrido alguna alteración sintetizan moléculas, tales como metaloproteasas de matriz extracelular, quimiocinas y factores de crecimiento, lo cual sugiere que el epitelio tiene una participación trascendental en la remodelación de la matriz extracelular que ocurre en el proceso fibrosante (1, 10, 11).

La matriz extracelular desempeña un papel importante en la arquitectura y la homeostasis tisular de organismos multicelulares. La MEC participa activamente en la regulación de procesos básicos tales como: la migración, proliferación, diferenciación y sobrevivencia celular (12-14). En el caso del tejido pulmonar, el principal componente de la matriz extracelular es la colágena (especialmente colágenas tipo I y III), la cual es producida y secretada por una variedad de células del estroma, predominantemente fibroblastos. Además de sintetizar colágenas, los fibroblastos producen elastina, fibronectina y otras moléculas que forman parte de la MEC, tales como factores de crecimiento y proteasas (1, 14).

Una segunda clase de moléculas que tienen una función esencial en la composición de la MEC, son los proteoglicanos; cuyo núcleo de proteínas es

unido covalentemente a glicosaminoglicanos de alto peso molecular, incluyendo condroitina, heparan y queratan sulfato (15).

Juntos, los componentes de la MEC, constituyen una estructura que aparte de ayudar a mantener la integridad tisular, regula la migración, proliferación y diferenciación celular y provee un reservorio de citocinas y factores de crecimiento.

En el proceso de remodelación tisular que ocurre después de un daño o agresión pulmonar, la degradación insuficiente y una sobre producción de los componentes de la MEC, conlleva a la acumulación de la misma, en los espacios y las paredes alveolares. En este proceso de remodelación participan diferentes poblaciones celulares, incluyendo macrófagos, células epiteliales bronquiolares y alveolares, células endoteliales y fibroblastos (2). La remodelación de la MEC es el resultado de múltiples procesos que varían de acuerdo al estímulo inicial así que los cambios estructurales y funcionales que se presentan en la MEC de un órgano dado durante una respuesta inflamatoria aguda, difieren de los que presentan, por ejemplo, en el desarrollo tumorigénico. Los procesos de remodelación están caracterizados por presentar dos eventos importantes: por un lado esta la síntesis y el depósito de los componentes de la matriz extracelular y por el otro la degradación proteolítica. De tal modo, diversas proteasas han sido implicadas en éste proceso, muchas de las cuales, son miembros de la familia de las metaloproteasas de matriz extracelular (16).

Metaloproteasas de Matriz Extracelular.

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP's por sus siglas en inglés), también conocidas como matrixinas, son una familia de endopeptidasas

dependientes de zinc que se agrupan dentro de la superfamilia de proteasas denominadas como metzincinas, que además incluye a las serralisinas, las astacinas y las adamelisinas (16-21). Las MMP's se diferencian de otra clase de proteasas porque su actividad catalítica depende de iones de metal de zinc, funcionan a pH neutro y son secretadas como zimógenos ó pro-enzimas (pro-MMP's) (16).

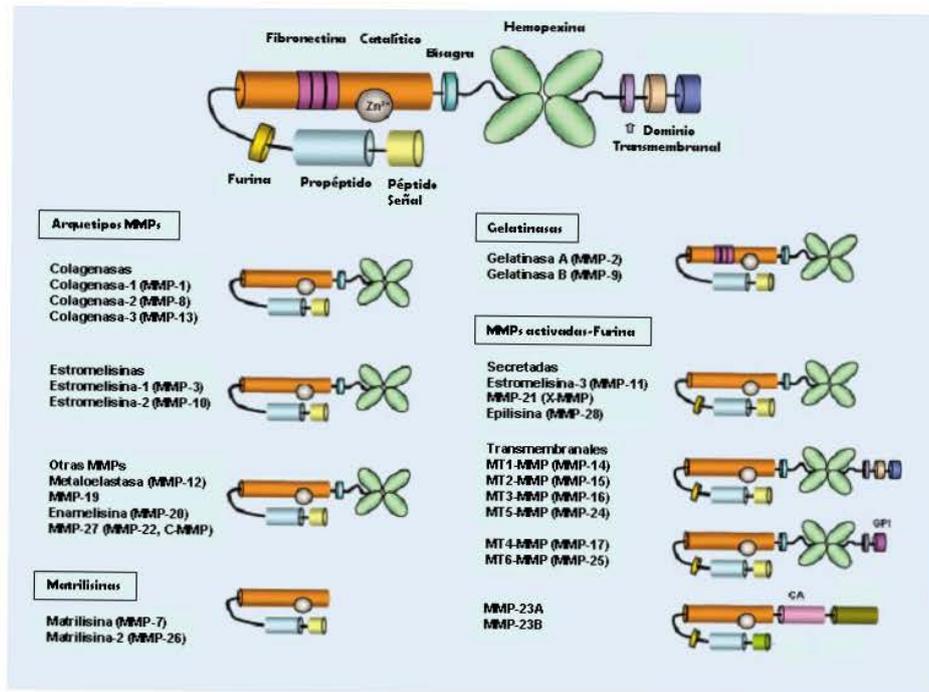
La MMP's presentan diferentes dominios: a) poseen una secuencia señal ó pre-dominio que se utiliza para dirigir la secreción de estas enzimas, b) tienen un pro-dominio en la región amino terminal (N-terminal), el cual está involucrado en preservar la latencia de las proteínas (zimógeno) por coordinación directa con el átomo de zinc del sitio activo, bloqueando de esta forma, el acceso del sitio catalítico con el sustrato. Este pro-dominio, posee un residuo de cisteína que se encuentra en una secuencia altamente conservada PRCGVDPV, c) presentan un dominio catalítico que tiene un sitio activo con una secuencia conservada HEXXHXXGXXH en la cual se une el Zn^{2+} catalítico y d) poseen un dominio carboxilo terminal (C-terminal, tipo hemopexina), que participa en el reconocimiento macromolecular del sustrato con la enzima y en la interacción con los inhibidores titulares de metaloproteasas (TIMP's por sus siglas en inglés) y se encuentra conectado al dominio catalítico mediante una región rica en prolina denominada bisagra (16,22).

La actividad de estas enzimas es crucial durante el desarrollo y morfogénesis de organismos multicelulares, así como también, participan en diversos procesos patológicos y fisiológicos, incluyendo aspectos del desarrollo embrionario, morfogénesis tisular, reparación de una herida, enfermedades inflamatorias y cáncer (17,18).

En un principio, las MMP's se clasificaban por su habilidad para degradar uno ó varios constituyentes de la matriz extracelular y membranas basales; adicionalmente, a todos los miembros de las MMP's se les ha asignado un número, el cual corresponde a la cronología de su identificación. Sin embargo, hoy en día las aportaciones derivadas de la secuenciación del genoma humano han permitido definir el juego completo de MMP's producidas por las células humanas. Estudios genómicos recientes han revelado que hay 24 genes diferentes que codifican para la familia de las MMP's de las cuales 23 se encuentran en humanos (23, 24).

La mayoría de las MMP's son secretadas como zimógeno hacia el espacio extracelular y solo algunas son expresadas como enzimas de superficie. Estudios recientes han mostrado que ciertas MMP's, tales como: MMP-1, MMP-2 y MMP-11 se pueden encontrar también dentro de la célula y pueden actuar sobre proteínas intracelulares (25-27).

De acuerdo a sus características funcionales y estructurales, así como a la similitud entre sus aminoácidos, en el humano las MMP's han sido clasificadas dentro de distintas subclases en: colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelisininas (MMP-3 y MMP-10), matrilisininas (MMP-7 y MMP-26), MMP tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) y otras que por sus características no pueden ser clasificadas dentro de los grupos anteriores (MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23 y MMP-28) (16, 17, 28).



Esquema 2. Clasificación estructural de las MMPs. (Folgueras AR, et al,2004,Int.J.Dev.Biol.48:411-424)

COLAGENASAS

Pertencen a este grupo la colagenasa intersticial (MMP-1), la colagenasa de neutrófilos (MMP-8) y la colagenasa 3 (MMP-13). Estas proteasas son caracterizadas por su habilidad para degradar colágenas fibrilares tipo I, II y III en su dominio de triple hélice, lo cual genera 2 fragmentos, uno de 3/4 en su extremo amino terminal y el otro de 1/4 en el extremo carboxilo terminal de la colágena (17,29). La degradación de colágenas fibrilares en su región de triple hélice provoca que estas proteínas se vuelvan inestables de manera que pierden su estructura secundaria y se transforman en gelatina y posteriormente puedan ser degradadas por otras MMP's. Estas enzimas llevan a cabo la degradación de las colágenas fibrilares en el sitio donde la secuencia de amino ácidos es similar; en la cadena $\alpha 1(I)$ la degradación ocurre entre los amino ácidos Gly 775/Ile 776 y en

la cadena $\alpha 2(I)$ corresponde a los amino ácidos Gly/Leu, a $\frac{3}{4}$ partes de la distancia del extremo amino terminal (28, 29).

GELATINASAS

La gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9) se caracterizan por tener insertadas tres repeticiones de una secuencia similar a fibronectina tipo II, en el dominio catalítico. Degradan gelatina, colágena tipo IV y laminina (30). La MMP-2 también degrada colágenas tipos I, II y III, elastina y fibronectina, actúa sobre varias quimiocinas y activa a la pro-MMP-1 y a la pro-MMP-9. Por su parte, la MMP-9 contiene una secuencia similar a la colágena tipo V, localizada entre el dominio catalítico y el de hemopexina, lo que la hace ser la más grande de las MMP's. *In vitro*, la MMP-9 degrada eficientemente colágena desnaturalizada, colágenas tipos IV, V y XI y elastina, además de que activa citocinas como IL1- β , TGF- β y convierte el plasminógeno en angiostatina (29, 30).

ESTROMELISINAS

La estromelisina-1 (MMP-3) y la estromelisina-2 (MMP-10) degradan a una amplia gama de sustratos entre los que destacan proteoglicanos, fibronectina, laminina, caseína, gelatina y colágenas tipos IV, IX y X. También pueden activar a la pro-MMP-9 y a pro-colagenasas, como a la MMP-1. La estromelisina 3 (MMP-11) usualmente está agrupada con otras MMP's, porque la secuencia y la especificidad de su sustrato diverge de la MMP-3 (27).

MATRILISINAS

Dos miembros conforman a este grupo, la matrilisina-1 (MMP-7) y la matrilisina-2 (MMP-26). Se caracterizan por la pérdida del dominio hemopexina y degradan

colágena tipo IV, laminina y entactina. La MMP-7 es secretada por células epiteliales y además de degradar componentes de la MEC puede actuar sobre moléculas de superficie celular como pro- α -defensina, Fas-ligando, TNF- α y E-caderina (31, 32). Por su parte, la MMP-26 se expresa en el útero, riñón y placenta y se encuentra elevada en padecimientos como el cáncer endometrial y de pulmón. La MMP-26 puede experimentar activación autocatalítica y puede activar a la pro-MMP-9 (33).

MMP's TIPO MEMBRANA (MT-MMPs)

Este grupo está formado por 6 miembros: cuatro se encuentran como proteínas transmembranales tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-24) y dos se anclan a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MMP-17 y MMP-25). Todas las MT-MMP's tienen un motivo que degrada furina hacia el final del propeptido y de ésta forma pueden ser secretadas en su forma activa. Con excepción de la MMP-17, todas las MT-MMP's son activadores fisiológicos de la pro-MMP-2. Estas enzimas pueden degradar ciertas moléculas de la MEC, en tanto, la MT1-MMP tiene actividad colagenolítica sobre la colágena tipo I, II y III (34, 35).

OTRAS MMP's

Este grupo lo conforman las MMP's que divergen en su secuencia y la especificidad de su sustrato con respecto a los cinco grupos anteriores. La estromelina-3 (MMP-11) puede ser activada intracelularmente en el Golgi por una proteasa similar a furina y es secretada como enzima activa. Se sabe que actúa sobre la α 1-antiproteasa y la proteína-1 unida al factor de crecimiento de insulina (IGFBP-1) y se expresa durante la embriogénesis, la involución tisular y la reparación de una herida (27, 36). La metaloelastasa (MMP-12) se expresa en

macrófagos, degrada elastina y tiene actividad sobre los componentes de membranas basales. Ha sido detectada en pulmón, páncreas, ovario, vaso y en intestino (29). La MMP-19 es constitutivamente expresada en la capa basal de la epidermis, promoviendo la proliferación de queratinocitos por degradación del IGFBP-3; puede hidrolizar colágena tipo IV, gelatina, tenascina, laminina, nidógeno y agregán (37). La enamelisina (MMP-20) digiere amelogenina y se localiza principalmente en el esmalte dental. La MMP-21 puede ser activada en la vía secretora por proteasas parecidas a furina, ha sido detectada en cáncer, en tejido neuronal y durante la embriogénesis del ratón. La MMP-22 fue clonada de fibroblastos de embrión de pollo, y un homólogo humano ha sido identificado conforme a la base de secuencias ETS, pero la función de esta enzima se desconoce hasta la fecha. *In vitro*, tiene actividad sobre gelatina y caseína y se expresa en linfocitos B de humano. La MMP-23 se expresa en tejido reproductivo y como característica particular pierde ambos switches; el de cisteína y de hemopexina (17, 29). Por último, la epilisina, o bien, MMP-28 es expresada principalmente por queratinocitos, lo cual podría sugerir que está involucrada en la homeostasis tisular y en la reparación de heridas (38).

La actividad proteolítica de las MMPs se regula a 3 niveles: a nivel transcripcional, a nivel de activación de la pro-enzima ó zimógeno y a nivel de la inhibición que se lleva a cabo en el espacio extracelular por la interacción con sus inhibidores. Existen otros mecanismos adicionales por los cuales la actividad de las MMPs son controladas, entre ellos la regulación de la estabilidad del RNAm, la eficiencia con la que se lleva a cabo la transducción, la compartimentalización de las enzimas y su secreción, el reclutamiento hacia la superficie celular, su afinidad por un sustrato, la endocitosis y la degradación intracelular (13, 22, 39).

La expresión de la mayoría de las MMP's es altamente regulada a nivel transcripcional por hormonas, factores de crecimiento, citocinas, interacciones célula-célula y célula-matriz (40). Por otro lado, casi en su totalidad, las MMP's son secretadas como zimógenos las cuales requieren ser activadas para degradar sus sustratos, proceso en el cual se lleva a cabo la eliminación de un fragmento amino-terminal de las MMP's. La activación extracelular es un mecanismo complejo, que involucra una perturbación de la interacción entre la cisteína conservada del pro-dominio y el zinc del sitio catalítico. Dicho mecanismo puede ser llevado a cabo *in vitro* por compuestos químicos como organomercuricos, detergentes, agentes caotrópicos y especies oxígeno reactivas (41).

Varias MMP's tienen una secuencia de reconocimiento tipo furina al final de su pro-dominio, la cual les permite ser activadas dentro de la célula en el Aparato de Golgi por proteasas parecidas a furina y entonces son liberadas en su forma activa. Una vez activadas, las MMP's pueden ser inhibidas *in vivo* por el inhibidor fisiológico α 2-macroglobulina, el cual está presente en plasma y en fluido de tejidos y más específicamente por la familia de los inhibidores tisulares de metaloproteasas (22, 41).

La familia de los TIMP's incluye cuatro miembros del TIMP-1 al -4). Los TIMP's se relacionan estructuralmente, tienen masas moleculares entre los 21 y los 30 KDa, con un 40-50% de similitud en sus secuencias y son estabilizados por seis puentes disulfuro. TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-4 son secretados extracelularmente en forma soluble, mientras que el TIMP-3 se encuentra asociado a la MEC. Los TIMP's se unen con alta afinidad al sitio catalítico de MMP's activas, en una proporción molar 1:1, lo que da como resultado la pérdida de la actividad proteolítica de las MMP's. Además de su actividad inhibitoria sobre las MMP's, los

TIMP's participan en otras funciones biológicas importantes como en la proliferación celular, la apoptosis y la angiogénesis. Adicionalmente algunos, como por ejemplo, el TIMP-2 participa en la activación de otras MMP's ya que forma un complejo tri-molecular en la superficie celular con la MT1-MMP y la pro-MMP-2, siendo este complejo ternario, importante para la activación de la pro-MMP-2 (42, 43).

En el pulmón y bajo condiciones normales, las MMP's y los TIMP's están involucrados en el desarrollo normal de este órgano, promoviendo la morfogénesis de ramificaciones y el desarrollo de las vías aéreas. En pulmón, varios tipos de células, incluyendo neutrófilos, macrófagos alveolares, células epiteliales y miofibroblastos producen diferentes MMP's y TIMP's (44, 45). La correcta coordinación entre la secreción y actividad de las MMP's, sus inhibidores (TIMP's) y otras moléculas como factores de crecimiento, regulan la estructura y función de un pulmón normal. Sin embargo, en diferentes procesos de daño pulmonar, el desequilibrio entre las MMP's y los TIMP's es de vital importancia para la reparación alveolar (46).

MMP's en FPI

Estudios recientes de microarreglos en FPI llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo han mostrado que algunas MMP's están muy elevadas en FPI (39, 56), éstas MMP's son la MMP-7, la MMP-1, la MMP-2 y MMP-9.

MMP-1 en la Fibrosis Pulmonar Idiopática

La MMP-1 ó colagenasa intersticial fue la primera colagenasa de vertebrados identificada. En humanos fue descrita en fibroblastos y ha servido como prototipo

para describir al resto de las MMP's. La MMP-1 presenta una afinidad muy alta por las colágenas fibrilares pero particularmente por la colágena tipo III, siendo la proteína más abundante de la matriz extracelular (28, 29). Esta enzima también es capaz de digerir sustratos no colagénicos encontrados en la matriz extracelular; incluyendo agregán, perlecán y citocinas como la interleucina-1 β (IL-1)- β y el factor de necrosis tumoral- α (TNF)- α , entre otros (48). Al igual que muchas MMP's, en condiciones normales la expresión de la MMP-1 es muy baja en muchas células y en el pulmón normal es casi imperceptible, aunque *in vitro* es producida por una amplia variedad de células normales como fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y epiteliales (47, 49). La MMP-1 es expresada *in vivo*, principalmente durante la remodelación tisular fisiológica y patológica; por ejemplo, durante el saneamiento de una herida, la colagenasa-1 es liberada por los queratinocitos regulando la migración celular, por la unión a la integrina $\alpha 2\beta 1$ y la colágena tipo I (50).

La MMP-1 es sintetizada como un polipéptido simple y es secretado como una pro-enzima, la cual tiene una forma no glicosilada de aproximadamente 57 kDa y una glicosilada menor de 61 kDa. La estructura del gen humano cuenta con 10 exones y está localizado en el cromosoma 11q22.2-22.3. Este gen es muy parecido a un grupo de ocho MMP's y dos pseudogenes, aunque interesantemente, el ortólogo de ratón (McolA) para MMP-1 humana, el cual sólo se ha encontrado en embriones de 12 días, presenta el 58% de identidad en sus aminoácidos y se halla distantemente relacionado, por lo que se podría inferir que hubo una evolución rápida en uno o en ambos linajes (51).

Interesantemente, se ha reportado que existen otras moléculas de la matriz que son sustratos para la MMP-1, por ejemplo; agregan, versican, perlecan, caseína,

nidógeno, serpinas y tenascina-C. Estudios recientes, han demostrado que la MMP-1 también es capaz de degradar moléculas de superficie celular y otros sustratos que no son de matriz, entre ellos están: la antiqumiotripsina, la antitripsina, la proteína de unión al factor de crecimiento de insulina (IGFBP)-3,-5, la IL-1 β , la L-selectina, la ovostatina, el TNF- α y el factor derivado de células del estroma-1 (29, 52).

La MMP-1 es considerada una molécula multifuncional; por ejemplo, esta enzima tiene un papel relevante en la morfogénesis epitelial, la cual depende del movimiento de células epiteliales, por lo que en este caso la migración de los queratinocitos sobre la colágena tipo I requiere de la degradación específica de la colágena y esta se lleva a cabo por la colagenasa-1, por lo que la expresión de esta enzima es constante en la etapa de saneamiento y posteriormente cesa cuando la re-epitelización ha sido completada (53). Cabe mencionar que adicional a la MMP-1, otras MMP's, como la MMP-7 participan en la migración de las células epiteliales posterior a un daño y se ha observado que MMP-1 y MMP-7, se encuentran altamente expresadas tanto en las células bronquiolares como en las células epitelio alveolares provenientes de pulmones con FPI (55).

Investigaciones hechas por multiarreglos en muestras de pulmones con FPI han mostrado inesperadamente una fuerte sobre-regulación de la MMP-1 (55). Esto representa una paradoja ya que en este padecimiento existe una excesiva acumulación de colágenas fibrilares que son el sustrato de esta enzima y lo que se hubiera esperado es una disminución de la misma. Aunque no hay una clara explicación para esta paradoja, la localización de la enzima en el pulmón fibrótico podría explicarlo parcialmente ya que se ha observado que la MMP-1 se encuentra localizada fundamentalmente en células del epitelio alveolar.

Interesantemente esta enzima está virtualmente ausente en los fibroblastos que se encuentran en las áreas fibróticas intersticiales donde las colágenas están siendo depositadas (47).

El papel que desempeña la MMP-1 en las células epiteliales en FPI se desconoce. Sin embargo, hallazgos llevados a cabo en reparación cutánea se ha visto que esta enzima se encuentra localizada en los bordes de las células, lo cual sugiere que favorece el mecanismo de migración. Por lo tanto, nuestra hipótesis fue que ésta enzima podría estar relacionada con la migración de las células epitelio alveolares tipo II, como se ha postulado que ocurre con los queratinocitos en la reparación de las heridas en piel (53).

Una forma de averiguar la función de una proteína es generando un ratón transgénico en el que se bloqueó la expresión de la misma (knock-out) (54). Así por ejemplo, se ha demostrado que el ratón deficiente en MMP-7 desarrolla menos fibrosis que el ratón silvestre cuando es expuesto a bleomicina (55,56). Sin embargo, esta aproximación no ha sido posible en el caso de la MMP-1 humana debido a que en el ratón la enzima que parecieran ser ortóloga de la MMP-1 está representado por dos enzimas llamadas McolA y McolB, que presentan sólo un 58% de similitud con la MMP-1 humana (51). Además, no se ha encontrado expresadas en pulmón.

En este contexto con el objeto de avanzar en el conocimiento sobre el papel que desempeña la MMP1 en células epiteliales, en este trabajo se transfectó una línea celular del epitelio pulmonar alveolar de ratón (MLE-12), que carecen de esta enzima con la MMP-1 humana.

OBJETIVO

Determinar la capacidad de migración y proliferación de la células MLE-12 y de las MLE-12 transfectadas con MMP-1 humana.

HIPÓTESIS

La presencia de MMP-1 en células epiteliales de pulmón aumentará su capacidad de migración y proliferación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Línea celular epitelial MLE-12.

Se usó una línea epitelial pulmonar de ratón llamada MLE-12, obtenida del American Type Culture Collection (ATCC Rockville, Md). Esta línea fue establecida por Kathryn A. Wikenheiser en 1992, extraída de tumores pulmonares de un ratón para en antígeno T SV40, el cual está bajo el control del promotor del gen de la proteína C del surfactante humano (57).

Cultivo de células.

Las células MLE-12 se crecieron hasta llegar a confluencia temprana (80-90%), en cajas T-25 con medio HITES suplementado con 2% de suero fetal bovino. Este medio está compuesto de una mezcla 50:50 de DMEM:Ham's F12 (Gibco, BRL) enriquecido con insulina [0.005 mg/ml], transferrina [0.01 mg/ml], selenito de sodio 30 nM (ITS, Sigma), hidrocortisona 10 nM (MP Biomedicals, LLC), β -estradiol 10 nM (Sigma), HEPES 10 nM (Sigma) y L-glutamina 2 mM (Sigma).

Transformación de E. Coli con el plásmido pQXCIP

Bacterias competentes. Se crecieron 20 μ l de células (DH5 α) en medio líquido LB (58) por toda la noche a temperatura ambiente (18°C) obteniendo una densidad óptica a 600 nanómetros de 0.6. El matr az se colocó en hielo 10 minutos y se centrifugó a 2500 x g (5000 rpm en rotor Sorvall GSA   3000 rpm en rotor Beckman J-6B) por 10 min. a 4°C. Posteriormente se resuspendió cuidadosamente en 80 ml de buffer de transformación (TB) estéril que contiene: Pipes 10 mM, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, pH 7.6). Se centrifugó

una vez más en las mismas condiciones mencionadas anteriormente y se resuspendió en 20 ml de TB frío al que se adicionó DMSO al 7% y se colocó en hielo por 10 min. Se hicieron alícuotas de 1-2 ml que se almacenaron en nitrógeno líquido.

Posteriormente se tomaron 100µl de bacterias y 1µl del plásmido (pQXCIP), se incubaron por 10 min en hielo y 2 min a 42°C, se le adicionó 1ml de LB y se mantuvo en agitación 100-150 rpm a 37°C durante 1 hr. Se plaquearon 50 µl en cajas LB+Amp y se incubaron a 37°C durante 24 hr.

Al día siguiente se seleccionaron 10 colonias para analizar a las que se ponen a crecer en tubos de 15 ml (Falcon) con 5ml de medio LB+ampicilina (Amp). Para este efecto, se tomaron con el asa las bacterias y se colocaron dentro del tubo, se incubaron a 37°C, con agitación de 100-150 rpm durante 24hrs.

Al día siguiente, se tomaron alícuotas de 800µl a las que se agregaron 200µl de glicerol al 50% estéril y se colocaron en crió tubos que se congelaron a -20°C.

Un ml de cada tubo se pasó a tubos eppendorf que se centrifugaron por 5 min., a 5000rpm a temperatura ambiente, posteriormente se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 100µl de buffer de lisis (EDTA 5mM, sacarosa 10%, SDS 0.25%, NaOH 100mM, KCl 60 mM, azul bromofenol 0.05%, H₂O) y se incubaron a 37°C por 5 min y en hielo 5 min mas después de lo cual se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min. Para determinar qué clonas incorporaron el plásmido, se toman 20µl del sobrenadante y se corrieron en un gel de agarosa al 1%.

Extracción y purificación del plásmido (Miniprep).

Se crecieron 10µl de bacterias en 2ml de medio LB con antibiótico durante 6hrs a 37°C con agitación a 250 rpm, posteriormente se incubaron en un matrás 50 ml

de medio LB+Amp con preinóculo y se dejaron creciendo toda la noche (por un máximo de 16 hrs). Al día siguiente se centrifugaron a 4000 rpm 10 min (Sorvall GSA) y se resuspendieron en 500µl de STEL (frío), se pasaron a un tubo de 2ml para centrifugarse en las mismas condiciones, posteriormente se decantó la preparación y se resuspendió en 200µl de STEL, y se mantuvo en hielo por 10 min. A continuación se resuspendieron por inversión en 640 µl de solución II (NaOH 0.1N, SDS 0.2%), y se incubaron 5 min en hielo, se adicionó 320 µl de solución III (Acetato de potasio 5M), se mezcló por inversión suavemente y se incubó 15 min en hielo, se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se le agregó 750 µl de isopropanol, se mezcló por inversión, se centrifugó en las mismas condiciones y el botón se resuspendió en 250 µl de TE al que se adicionó 5 µl de RNasa y se incubó 45-65°C durante 2 hrs. Posterior a la incubación se le agregaron 250 µl de fenol pH 8 y 125 µl de cloroformo, se centrifugó a 8000 rpm 5 min, se recuperó la fase acuosa y se le agregaron 75 µl de acetato de sodio 3M pH 5, más 500 µl de etanol puro, se incubó 10 min a –20°C y se centrifugó a 8000 rpm 10 min a 4°C, el botón obtenido se resuspendió en 500 µl de TE y se incubó a 45°C, se le agregaron 25 µl de CTAB al 5% (Cetyltrimethylammonium Bromide) y se incubó a 45°C por 5 min, se centrifugaron a temperatura ambiente 5 min a 8000 rpm sin enfriar. Se resuspendió en 60 µl de NaCl 1.2 M + 114 µl de etanol, se centrifugó a 8000 rpm 10 min. Por último el botón se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió en 100 µl de TE.

Plásmidos pSP64 y pQCXIP.

El plásmido pSP64 fue obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD); proviene de la clona pCllase 1, tiene un tamaño total de 5.1 Kb, dicho plásmido tiene clonado la secuencia codificante completa de la colagenasa intersticial-1 humana (MMP-1), posee un marcador de resistencia a ampicilina. Dicho plásmido fue digerido con las enzimas de restricción Ava I y Bgl II, para obtener el inserto MMP-1, se corrió en un gel de agarosa al 1% y se purificó con kit de extracción (Gel extraction kit, Qiagen).

El plásmido retroviral pQCXIP (7.2 Kb) expresa un gen de resistencia a Puromicina. Este plásmido puede expresarse transitoriamente ó establemente como un transcrito genómico viral que contiene el promotor para CMV inmediato al gen de interés. El vector pQCXIP fue digerido con las enzimas Age I y BamH I y purificado con el Kit de extracción (Qiagen).

La restricción se realizó de tal forma que dichas enzimas fueran compatibles entre sí, esto con el fin de que la ligación del vector (Age I, BamH I) con el inserto (Ava I, Bgl II) fuera en la dirección correcta (sense).

Reacción de ligación pQCXIP/MMP-1.

La reacción de ligación se llevó a cabo entre el DNA extranjero (MMP-1) y el vector de expresión pQCXIP, una vez que fueron digeridos con las enzimas antes mencionadas. En un volumen de 20 µl se colocaron 50-100ng de plásmido pQCXIP (DNA), 4 µl de buffer de ligación 5X, 1 µl de T4 DNA ligasa, y 3 ng del inserto de la MMP-1. Para realizar la ligación en la razón de 1:1 de extremos de moléculas de DNA que involucra la formación de nuevas uniones entre residuos fosfato que se encuentran localizados en el extremo 5' del DNA de doble cadena

y el hidroxilo adyacente localizado en el extremo 3' se pueden usar *in vitro* dos diferentes DNA ligasas, la *E. Coli* DNA ligasa y la bacteriófago T4 DNA ligasa, siendo ésta última la que más se usó por ser mas eficiente.

Se mezcló el vector de expresión pQCXIP con el inserto de la MMP-1 humana y se centrifugó por 5 seg en nanofuga y se incubó a 22°C toda la noche, al día siguiente se paró la reacción con 1 µl de EDTA 0.5M. Los ratios de las ligaciones utilizados fueron 1:1, 3:1 y 1:3 vector-inserto respectivamente.

Transformación.

Se pre-calentaron las placas de agar LB+Amp [1µl/ml] a 37°C, aproximadamente 20 min antes del plaqueo. Se creció una colonia de bacterias DH5α en 2ml de medio LB durante 2 horas a 37°C. Se obtuvo el botón de bacterias por centrifugación a 5000 rpm 10 min. Se resuspendió en 300 µl de solución T (cantidades iguales de solución A + solución B, Transformation kit, Fermentas) se mantuvo en hielo la solución T. Se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 300µl de solución T, se incubó en hielo 5 min. Se centrifugó una vez más y se resuspendió en 120µl de la solución T y se incubó en hielo 5 min. Se colocó 2.5µl de cada ligación en un tubo nuevo y posteriormente en hielo 2 min. se adicionó 50 µl de las células resuspendidas a cada tubo y se incubó en hielo 5 min. Por último se plaqueó las células en placas de agar LB+Amp anteriormente pre-calentadas y se incubaron toda la noche a 37°C.

Análisis de las clonas.

Se seleccionaron 10 clonas de cada ligación, de las cuales se hizo una mini-prep para la amplificación del plásmido+inserto y someterla a una digestión con la

enzima de restricción EcoRI para comprobar que el inserto (MMP-1) se había clonado correctamente. La reacción se realizó en 10 μ l: DNA 5 μ g, Enzima Eco RI 1 μ l, Buffer reactivo 3 μ l, agua estéril para aforar a 10 μ l, se incubó 2 hrs a 37°C y se corrieron 2 μ l de la reacción en un gel de agarosa al 0.8% para su análisis. Posteriormente se purificó con el kit de extracción (Qiagen), para poder transfectar con el plásmido con buena pureza.

Transfección celular.

Se cultivaron células epiteliales pulmonares MLE-12 y se dejaron que llegaran a confluencia temprana (80-90%), una vez alcanzada esta confluencia se tripsinizaron y se pasaron a cajas T-25, al día siguiente se tripsinizó una vez más, esto con el fin de que las células estén en fase logarítmica de su crecimiento, y se sembraron cajas de 35 mm con 150,000 células en cada caja. Justo antes de transfectar se les realizó un cambio de 700 μ l de medio de cultivo. En un tubo eppendorf se agregó 1 μ g de plásmido sólo ó con plásmido conteniendo el cDNA de la MMP1, 1 μ l del reactivo PLUS (Invitrogene), 4 μ l de lipofectamina y 25 μ l de medio, se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente y se le agregó a los 700 μ l de medio de cultivo. Se incubaron durante una noche a 37°C. Al día siguiente se les cambió medio nuevo y se agregó puromicina 10 μ g/ml, y se dejaron seleccionar por 5 días para obtener clonas estables. La expresión de la colagenasa se comprobó por RT-PCR.

Extracción de RNA.

El RNA total de las células, se extrajo con el reactivo de TRIZOL (Life Technologies). Dicho reactivo consta de una solución monofásica de fenol y de

isotiocinato de guanidina que se basa en el método de (59). Las células se lisaron directamente del cultivo, para lo que se adicionó 1 ml de TRIZOL por cada 10 cm² de área, pipeteando el lisado varias veces. Las células homogenizadas se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, permitiendo así la disociación completa del complejo nucleoproteico. Posteriormente, se adicionó 0.2 ml de cloroformo por 1 ml de TRIZOL, las muestras fueron agitadas vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron una vez más a temperatura ambiente por 3 minutos. Después se centrifugaron a 1200 x g durante 15 minutos a 4°C. Se formaron dos fases, la inferior (fenol-cloroformo) de color rojo y la superior incolora acuosa que contenía el RNA.

La fase acuosa fue transferida sin mezclar con la fase inferior a un tubo nuevo, las muestras fueron precipitadas con 0.5 ml de isopropanol por 1 ml de TRIZOL y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron a 1200 x g a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante fue desechado por inversión y los tubos fueron colocados sobre papel secante. El botón (RNA) que se obtuvo se lavó con 1 ml de etanol al 75% por 1 ml de TRIZOL, la muestra se mezcló por vórtex y se centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C. Por último, el sobrenadante se desechó una vez más por inversión y se dejó que se secase el botón de RNA, se resuspendió cuidadosamente por pipeteo en 15-20 µl de agua DEPC (Libre de RNasas) y se almacenó a -70°C.

Para determinar la cantidad y pureza del RNA extraído, se tomó 1 µl de la solución de RNA total y se resuspendió en 750 µl de agua DEPC, se cuantificó a una absorbancia de 260/280 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer MBA 2000).

RT-PCR.

Para evaluar el transcrito de la colagenasa-1, se desarrolló la técnica de conversión del RNA a cDNA mediante retrotranscripción con la enzima transcriptasa reversa, seguida de la amplificación del cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa, con oligonucleótidos específicos, aplicando un ensayo semicuantitativo y utilizando un termociclador (Perkin Elmer, 9600. Branchburg, NJ). Un microgramo de RNA fue tratado con una unidad de DNAsa (Life Technologies, Grand Island, NY), durante 15 minutos para eliminar el DNA genómico. Posteriormente, se le agregó 1 µl de EDTA 25mM y se incubó a 65°C para inactivar la DNAsa. Para sintetizar el cDNA se utilizó el kit Advantage RT-for-PCR (Clontech, Palo Alto CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Por consiguiente; 1 µg 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), 20 pmol de hexámeros iniciadores, una mezcla de nucleótidos de concentración 10mM de cada uno, 20 unidades de inhibidor de RNAsas recombinante y 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa (Molones-Murine Leucemia Virus reverse transcriptase) y llevada a 20 µl de solución final con agua DEPC. Una vez obtenido el cDNA, se utilizaron primers específicos para su amplificación mediante PCR, los primers utilizados fueron: primer sense 5' – 3' AAGTTATTCCAAAATGATAG, y primer antisense 5' – 3' TGCAGTTGAACCAGCTATTA. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25 µl, el cual contenía: 2 µl de cDNA, 20 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, una mezcla de nucleótidos 200 µM de cada uno, 1 µM de cada primer y 1.25 unidades de la enzima Taq Gold PCR (Roche, Branchburg, NJ) y se aforó a 25 µl con agua estéril filtrada. Las condiciones de ciclaje para la

amplificación de la MMP-1 fueron: 95°C/10min.; 40 ciclos de 3 pasos cada uno: desnaturalización a 95°C/20s, alineamiento de primers a 55°C/20 s y un paso de extensión a 72°C/20s. Por último, el producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 1%.

Western Blot

Células MLE-12 y células MLE-12 transfectadas con la MMP-1 humana (MLE-12/MMP-1) se cultivaron en cajas de 25 cm² y se mantuvieron en 5 ml de medio HITES suplementado con suero al 2%. Después de 24 horas el medio condicionado fue colectado y centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos a 4°C y se concentró 200X utilizando una columna Amicon Ultra de 5000 MWCO (Millipore Corporation). Adicionalmente, las células se lavaron 2 veces con PBS en frío y se lisaron sobre hielo en 100µl de buffer lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 1%, PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1µg/ml y pepstatina 1 µg/ml). El lisado celular fue sonicado y centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante y la concentración de proteína fue determinada mediante el método de Bradford utilizando el reactivo BioRad Protein Assay (BioRad Laboratories, Inc. Hercules, CA). Alícuotas de 25 µl de los medios condicionados y alícuotas de los lisados celulares conteniendo 40 µg de proteína fueron mezclados V/V con buffer Laemmli y las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK.) durante 1 ½ hrs a 100V. Después de bloquear los sitios inespecíficos en la membrana con leche descremada al 5% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, las

membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario contra la MMP-1 humana (Mouse anti-human-MMP-1, Chemicon MAB3307, 1:2000). Después de lavar 4 veces con Tris base 10 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05%, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario Goat anti-Mouse-HRP (Jakson, 1:5000) 1 hora a temperatura ambiente. La marca fue revelada con el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire UK) utilizando una placa fotográfica para rayos X (X-OMAT; Eastman Kodak).

Ensayo de reparación de una herida in vitro.

Las células epiteliales MLE-12 y MLE-12/MMP-1 se crecieron en placas de 6 pozos a una densidad de 5×10^6 células por pozo. Una vez que estas células alcanzaron 75 % de confluencia, se lavaron tres veces con medio HITES sin suero y con una punta de micropipeta estéril de 200 μ l se hizo una herida linear. Después de hacer la herida, las células fueron lavadas vigorosamente con medio HITES sin suero para remover los restos celulares. Posteriormente se adicionaron 2 ml de medio HITES con suero al 2% con y sin EGF (R&D Systems, Inc.) a una concentración de 100ng/ml y entonces la herida fue monitoreada a 12, 24, 36 y 48 horas y fue fotografiada con una cámara SC-35 tipo 1 montada sobre un microscopio invertido Olympus. Todos los experimentos fueron hechos por triplicado.

Ensayo de migración en cámara Boyden.

El ensayo de migración se llevó a cabo utilizando un ensayo cuantitativo de migración celular (Chemicon Temecula, CA), el cual utiliza cámaras Boyden de 24

pozos con una membrana de 8µm de diámetro, la cual está cubierta con colágena tipo I. Las células epiteliales tipo II se mantuvieron en cultivo hasta que llegaron a confluencia temprana (~75%), posteriormente el medio de cultivo se removió y se hicieron dos lavados con PBS estéril. Las células fueron colectadas con tripsina/EDTA, centrifugadas a 1500rpm durante 10 min. y resuspendidas en medio HITES con albúmina sérica bovina (BSA) al 5%. La suspensión celular (5×10^5 células/pozo) se adicionó a la parte superior de la cámara. En la parte inferior de la cámara se adicionaron 300µl de medio con BSA al 5% y el factor de crecimiento epidérmico (EGF [100ng/ml]). Adicionalmente, cámaras que estuvieron cubiertas únicamente con BSA fueron utilizadas como blanco para cada muestra. Después de incubar 24 h a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de aire, las células que no migren y que se encuentren en la parte superior de la membrana serán removidas con cotonetes húmedos y posteriormente lavadas. La migración de las células fue determinada colorimétricamente como lo indica el fabricante. Las células fueron teñidas ligeramente y el color se eluyó con 300µl de buffer de extracción y entonces se determinó la absorbancia en un lector de ELISA a 545 nm. Todos los experimentos fueron hechos por duplicado.

Ensayo de proliferación de células epitelio alveolares tipo II.

Las células se sembraron en cajas de 96 pozos a una densidad celular de 1.5×10^4 células/pozo. Después de 18 hrs cada uno de los pozos se lavaron 2 veces con medio sin suero y entonces se adicionó medio HITES con suero al 2% o medio HITES con suero al 2% más EGF [100ng/ml]. El número de células viables en cada uno de los pozos fue monitoreado a 12, 24, 36 y 48hrs utilizando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Boehringer Mannheim), el cual es una sal

de tetrazolio que forma un cromóforo soluble llamado formazán en la cadena respiratoria y su absorbancia es proporcional al número de células viables presentes en la caja de cultivo. Brevemente, al final de cada uno de los tiempos el medio condicionado de cada pozo fue remplazado con medio HITES más 10 μ l del reactivo WST. Después de incubar 2 ½ hrs a 37°C, el medio se colectó y se determinó la absorbancia de las muestras en un lector de ELISA a 450 nm, utilizando un filtro de referencia a 620 nm ($Abs_{450nm}-Abs_{620nm}$). Para determinar el porcentaje de crecimiento celular, se obtuvo la diferencia del aumento en los valores de absorbancia a los diferentes tiempos respecto a los valores de absorbancia al inicio del ensayo. Todos los datos obtenidos fueron hechos por triplicado.

Análisis estadístico

Todos los valores se expresan como el promedio \pm la desviación estándar. Para evaluar si existen o no diferencias significativas, a los resultados se les aplicó un análisis de varianza de una vía, utilizando el método de Dunnett con el programa estadístico inerSTAT-a v1.3.

RESULTADOS

Expresión de la MMP-1 en células epiteliales tipo II MLE-12

Las células MLE-12 fueron transfectadas con el vector que contenía el cDNA de la colagenasa-1 humana (MMP-1) y la expresión de esta enzima fue analizada por RT-PCR. Como se puede observar en la Figura 1, las células MLE-12 sin transfectar y las células transfectadas únicamente con el vector pQCXIP no

de tetrazolio que forma un cromóforo soluble llamado formazán en la cadena respiratoria y su absorbancia es proporcional al número de células viables presentes en la caja de cultivo. Brevemente, al final de cada uno de los tiempos el medio condicionado de cada pozo fue remplazado con medio HITES más 10 μ l del reactivo WST. Después de incubar 2 ½ hrs a 37°C, el medio se colectó y se determinó la absorbancia de las muestras en un lector de ELISA a 450 nm, utilizando un filtro de referencia a 620 nm ($Abs_{450nm}-Abs_{620nm}$). Para determinar el porcentaje de crecimiento celular, se obtuvo la diferencia del aumento en los valores de absorbancia a los diferentes tiempos respecto a los valores de absorbancia al inicio del ensayo. Todos los datos obtenidos fueron hechos por triplicado.

Análisis estadístico

Todos los valores se expresan como el promedio \pm la desviación estándar. Para evaluar si existen o no diferencias significativas, a los resultados se les aplicó un análisis de varianza de una vía, utilizando el método de Dunnett con el programa estadístico inerSTAT-a v1.3.

RESULTADOS

Expresión de la MMP-1 en células epiteliales tipo II MLE-12

Las células MLE-12 fueron transfectadas con el vector que contenía el cDNA de la colagenasa-1 humana (MMP-1) y la expresión de esta enzima fue analizada por RT-PCR. Como se puede observar en la Figura 1, las células MLE-12 sin transfectar y las células transfectadas únicamente con el vector pQCXIP no

expresan esta enzima (carriles 1 y 2, respectivamente). Sin embargo, en las células transfectadas con la MMP-1 (MLE-12/MMP-1) se observó la expresión del transcrito correspondiente a la MMP-1 humana (carril 3). El carril 4 muestra la expresión de la MMP-1 en una línea de fibroblastos de pulmón normal que se usó como control positivo ya que estas células expresan esta enzima.

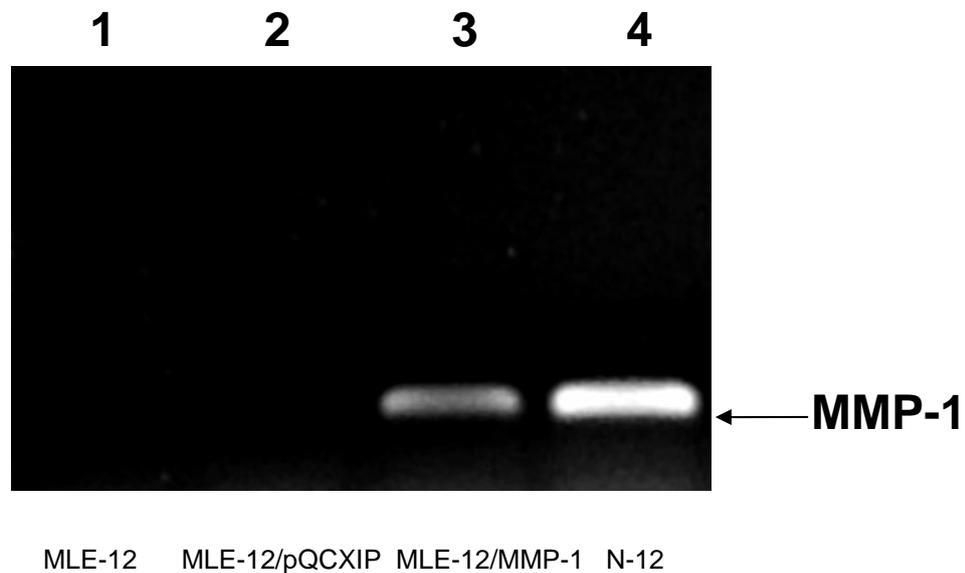


Fig. 1 Expresión de la MMP-1 en células de ratón MLE-12.

En un experimento adicional, las células transfectadas con la MMP-1 fueron estimuladas por 6 hrs con PMA (un inductor de la expresión de MMP-1). Como se muestra en la Figura 2, el estímulo con PMA indujo una mayor expresión de MMP-1 (carriles 4-6) con respecto a las células transfectadas que no fueron tratadas con PMA (carriles 1-3).

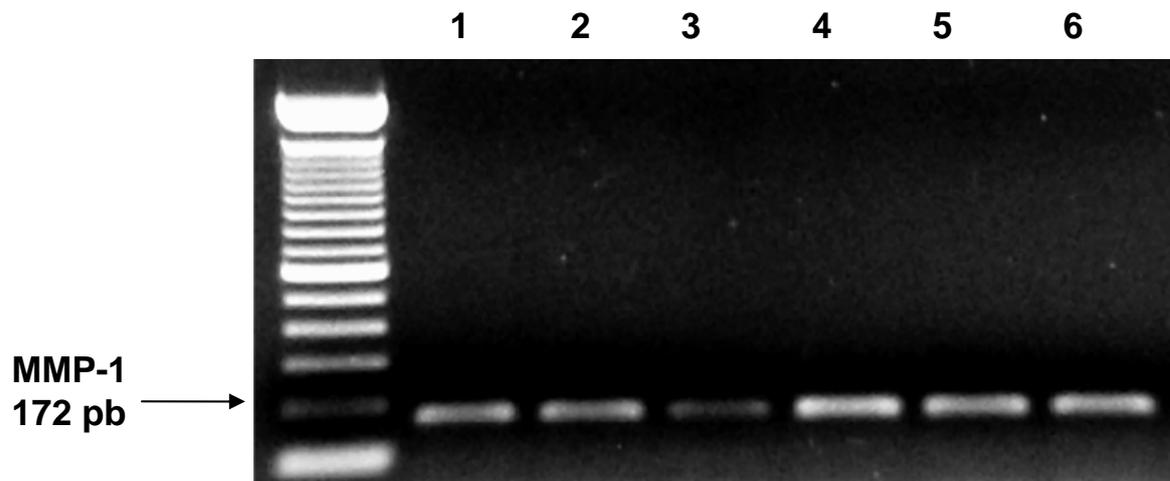


Fig. 2 Expresión de la MMP-1 en células de ratón MLE-12 transfectadas con la MMP-1 humana con y sin PMA.

Análisis de la MMP-1 por Western blot

Para analizar la expresión de la MMP-1 se llevó a cabo un western de medio condicionado y de lisado celular de las células MLE-12 que fueron transfectadas con la MMP-1 humana. Como se puede observar en la figura 3, en los carriles 3-5 no se pudo detectar la expresión de la proteína MMP-1 ni en medio condicionado ni en el lisado celular (la foto del lisado no se muestra), comparado con el control positivo el cual es una línea de fibroblastos de pulmón humano que si expresan esta enzima (carril 6). En los carriles 1 y 2 se muestran los medios de las células MLE-12 y MLE-12/pQCXIP, las cuales no hacen la MMP-1.

1 2 3 4 5 6

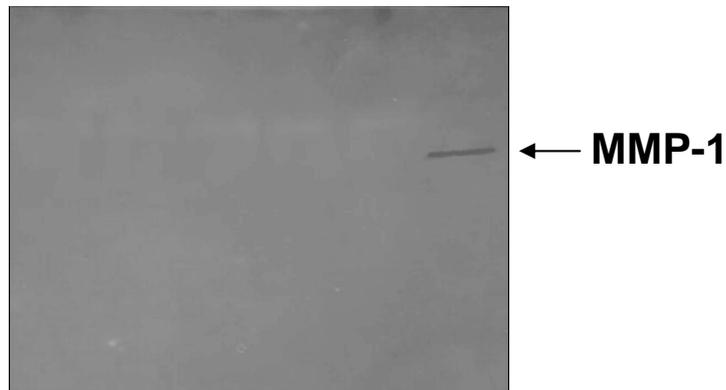


Fig. 3 Inmunoblot para MMP-1 de medio condicionado proveniente de células MLE-12 (carril 1), MLE-12/pQCXIP (carril 2) y MLE-12/MMP-1 (carriles 3-5), línea de fibroblastos N-12.

Papel de la MMP-1 en la reparación de una herida

El efecto de la MMP-1 en la migración de células epiteliales después de una herida fue analizado por medio de un ensayo *in vitro*. Las células MLE-12 sin transfectar y las transfectadas con MMP-1 se crecieron en monocapa y una vez que llegaron a confluencia temprana (75%) se hizo una herida manualmente usando una punta para micropipeta.

Como se puede observar en la Figura 4, después de haber hecho la herida y conforme transcurre el tiempo, las células sin transfectar (paneles A-E) y las transfectadas con MMP-1 (paneles F-J) migran y van cubriendo el área desnuda provocada por la herida. Después de 48 horas las células transfectadas con la MMP-1 (panel J) cubren un mayor porcentaje del espacio dejado por la herida en comparación con las células que no están transfectadas (panel E) (61% en MLE-12/MMP-1 vs 23% en MLE-12).

Efecto del EGF en la reparación de una herida in vitro

Para determinar si el EGF modifica la respuesta a la reparación de la herida, células MLE-12 wild type y transfectadas (MLE-12/MMP-1) que fueron crecidas y a las cuales se les hizo una herida como se describió anteriormente, se estimularon con EGF [100ng/ml] durante los tiempos antes mencionados. Se observó que después de haber hecho la herida las células wild type y las transfectadas van cubriendo progresivamente el espacio dejado por la herida conforme pasa el tiempo (Figura 5). Sin embargo, las células transfectadas con MMP-1 cubrieron en su totalidad el área desnuda desde las 36 horas (panel I) mientras que las wild type solo lograron cubrir aproximadamente el 60 % del área después de 48 horas (panel E), lo cual indica que el estímulo con EGF favoreció en mayor medida el cierre de la herida en las células que contienen la MMP-1 humana.

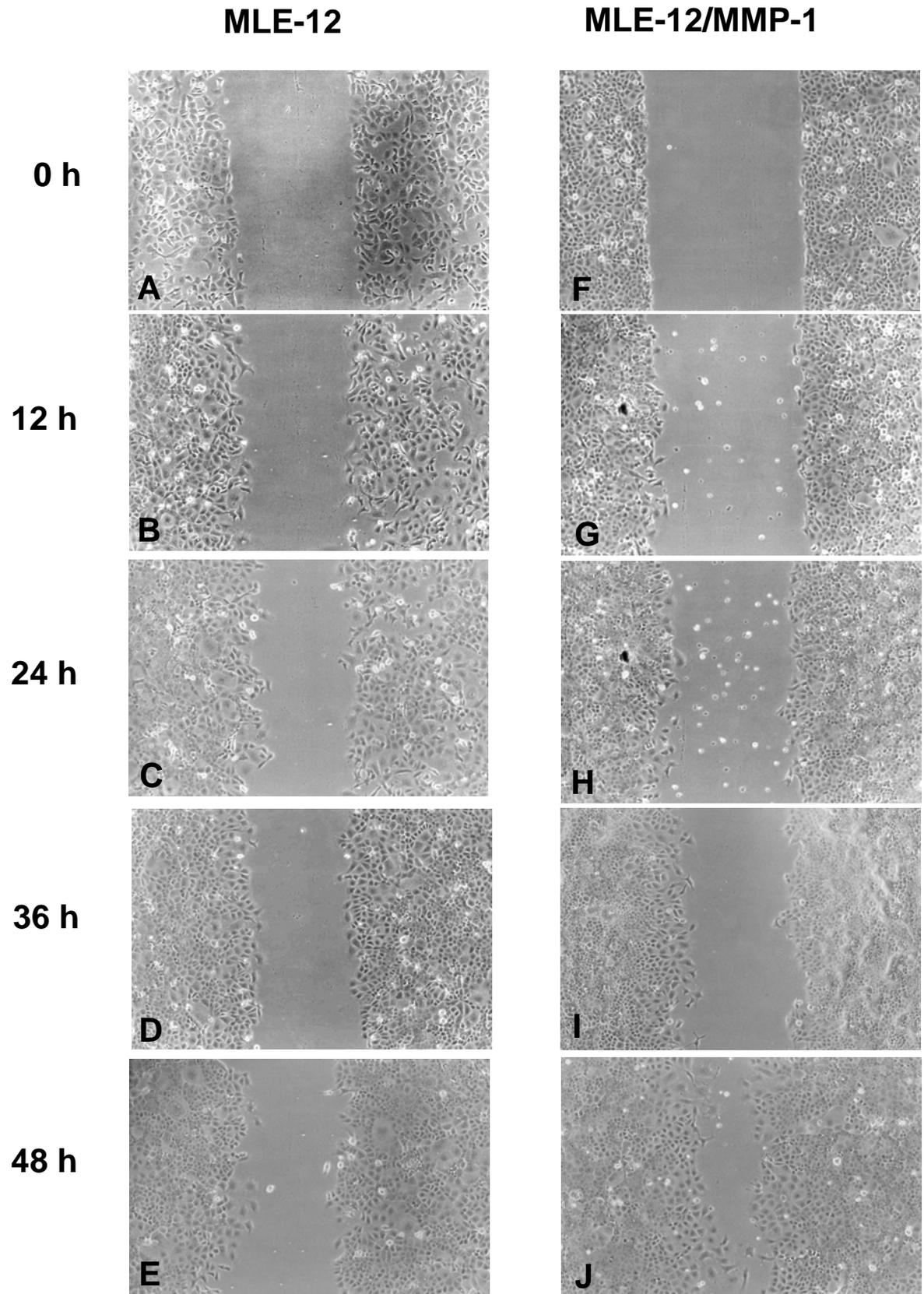


Fig.4 Ensayo de reparación de una herida *in vitro* en células epitelio alveolares tipo II de ratón wild type (Panel A-E), y células epiteliales transfectadas con la colagenasa-1 (MMP-1) (Panel F-J).

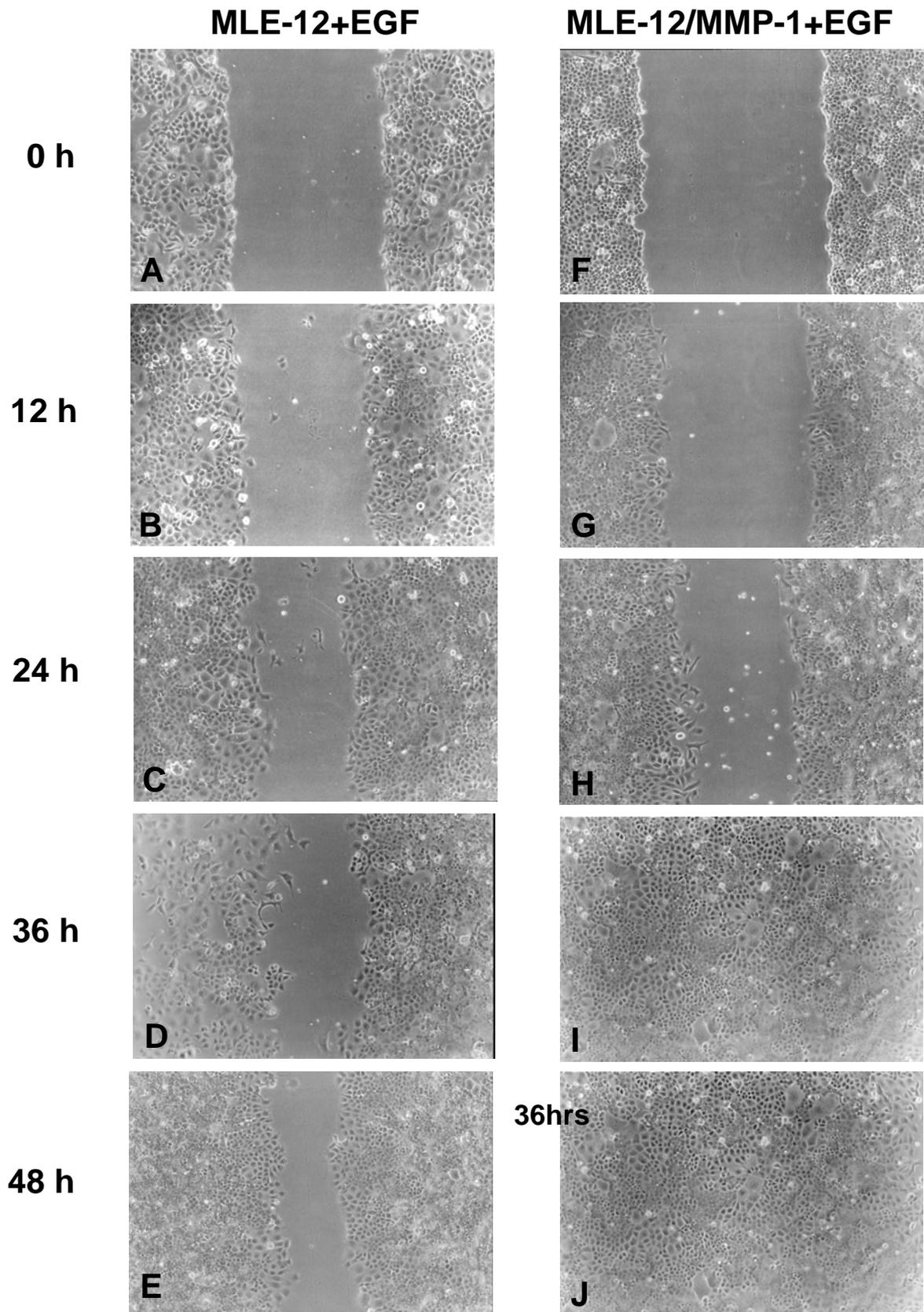
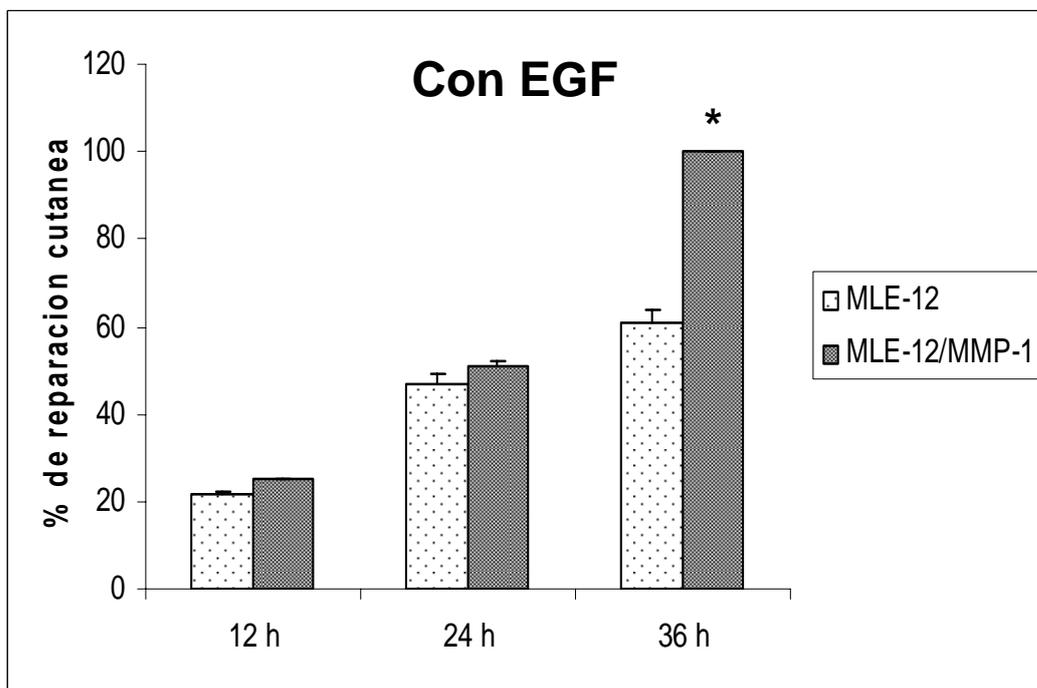
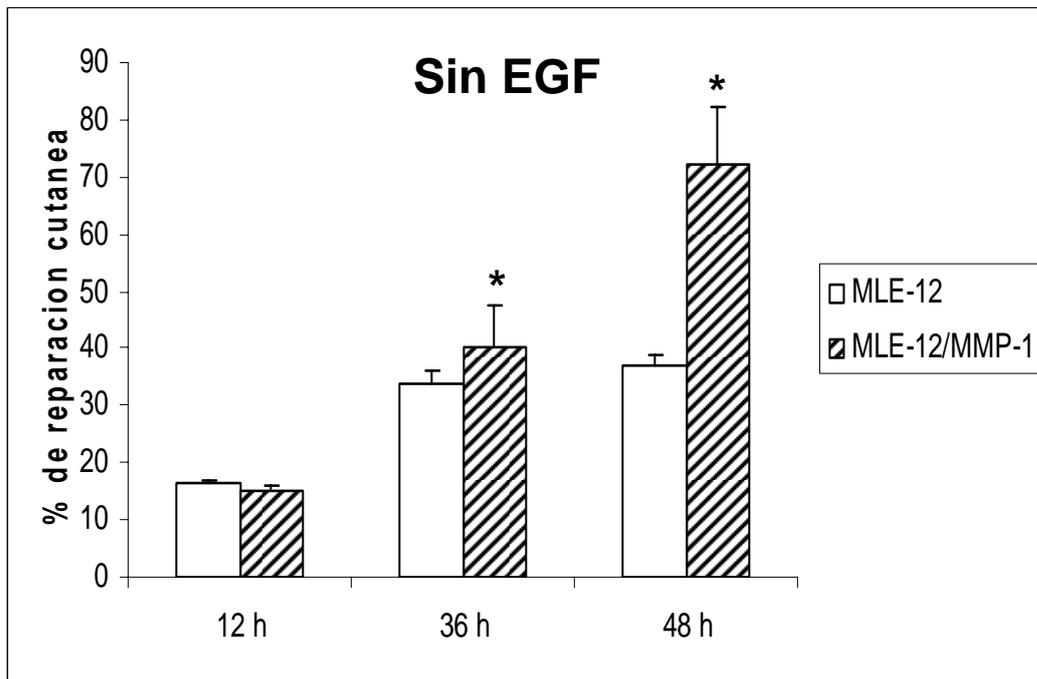


Fig.5 Efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la velocidad de reparación epitelio alveolar in vitro en células wild type (MLE-12) panel A-E y células epiteliales transfectadas con la MMP-1 (Panel F-J).



Ensayo de reparación de una herida *in vitro* en células epitelio alveolar. Las gráficas muestran el promedio \pm desviación estándar del porcentaje del cierre de la herida a diferentes tiempos respecto al valor inicial, * $p < 0.05$.

Ensayo de migración en la cámara tipo Boyden

Adicional al ensayo de la herida y para determinar si la transfección con MMP-1 modifica la migración de las células epiteliales MLE-12 a través de colágena para lo cual se analizó la migración de estas células en una cámara tipo Boyden con una membrana recubierta con colágena tipo I que es el sustrato de la MMP-1. En este ensayo se utilizó EGF [100 ng/ml] como quimioatrayente.

Como se observa en la figura 6, después de 24 horas las células que fueron transfectadas con la MMP-1 migran significativamente más en comparación con las células que no están transfectadas (MLE-12) (0.388 ± 0.04 en MLE-12/MMP-1 versus 0.244 ± 0.02 en MLE-12; $p < 0.05$).

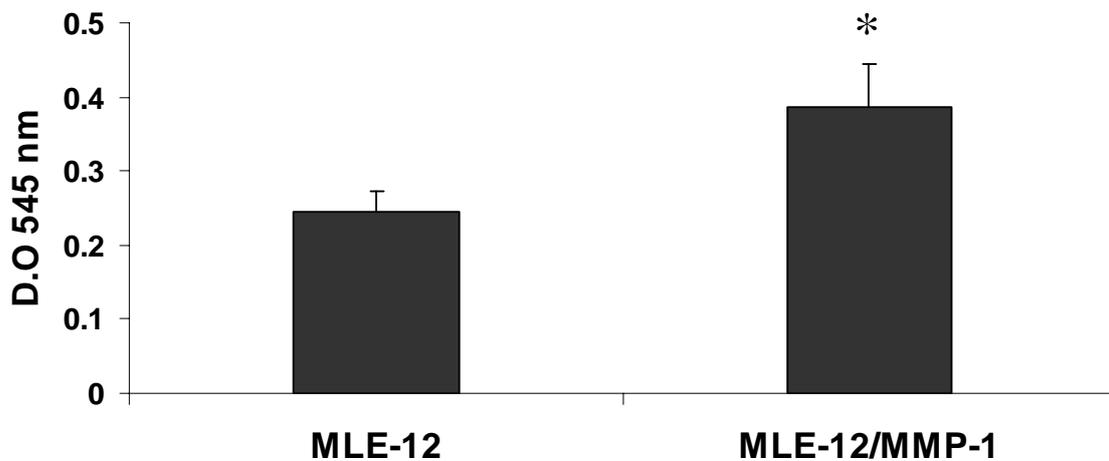


Fig.6 Migración de células epiteliales MLE-12 wild type y transfectadas con MMP-1 en cámara Boyden. * $p < 0.05$.

Proliferación de células epiteliales MLE-12

Para establecer si la MMP-1 tiene un efecto en la proliferación de las células epiteliales de ratón, se determinó la tasa de crecimiento de las células MLE-12 y las células MLE-12 transfectadas con la MMP-1 humana (MLE-12/MMP-1) que

fueron mantenidas en medio HITES suplementado con suero al 2% durante 12, 24, 36 y 48 horas, utilizando el reactivo comercial de proliferación celular WST-1. Los resultados se muestran como el porcentaje de crecimiento celular sobre el valor basal.

Como se muestra en la Figura 7, a las 12 y 24 horas no se encontraron diferencias en el porcentaje de crecimiento de las células transfectadas (MLE-12/MMP-1) con respecto a las células sin transfectar. Sin embargo, a las 36 horas se observó un incremento significativo en la tasa de crecimiento de las células epiteliales que contienen la colagenasa-1 con respecto a las células que no están transfectadas ($300 \pm 20.7\%$ en MLE-12/MMP-1 vs $254 \pm 11\%$ en MLE-12; $p < 0.05$). Después de 48 horas las células mantuvieron el mismo comportamiento ($394 \pm 33.6\%$ en MLE-12/MMP-1 vs $300 \pm 11\%$ en MLE-12; $p < 0.01$).

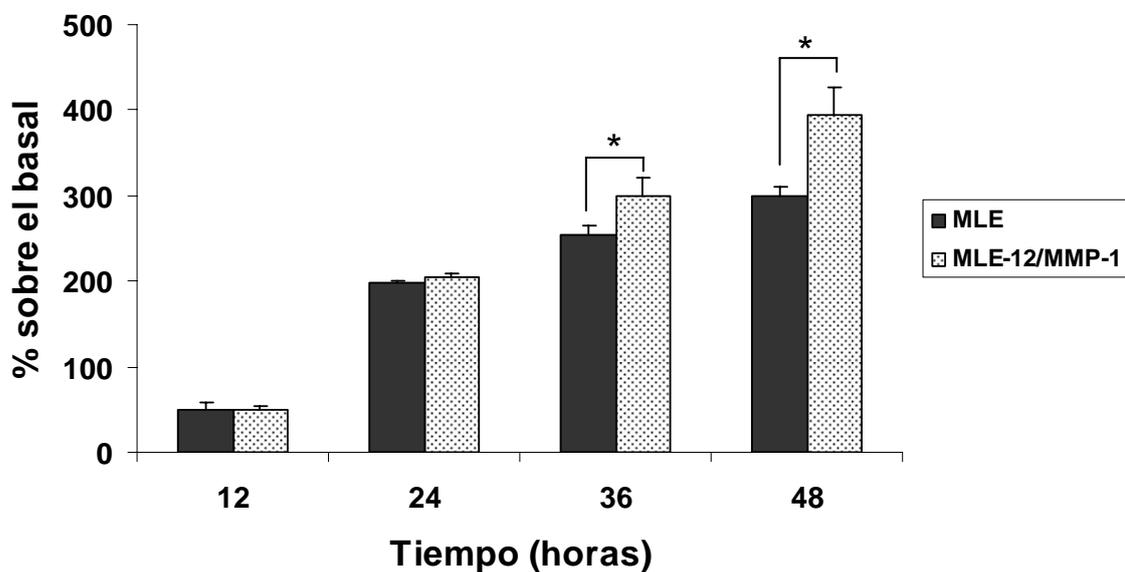


Fig.7 Tasa de crecimiento de células epiteliales de ratón propagadas en medio HITES suplementado con SFB al 2%, * $p < 0.05$.

En un experimento adicional, se ensayo la tasa de crecimiento de las células transfectadas y sin transfectar que fueron crecidas en medio HITES con 2% de SFB más EGF [100ng/ml] a los tiempos indicados. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 8. En este ensayo no hubo diferencias en la tasa de crecimiento de las células transfectadas y sin transfectar a 12 y 24 horas. A 36 y 48 horas se observo un incremento en la proliferación de las células con MMP-1 en comparación con las células que no la tienen ($328 \pm 7.8\%$ a 36 hrs y $445 \pm 10\%$ a 48 hrs en MLE-12/MMP-1 versus $281 \pm 6.3\%$ a 36 hrs y $403 \pm 11\%$ a 48 hrs en MLE-12; $p < 0.01$). Los resultados de ambos experimentos se resumen en la Tabla 1.

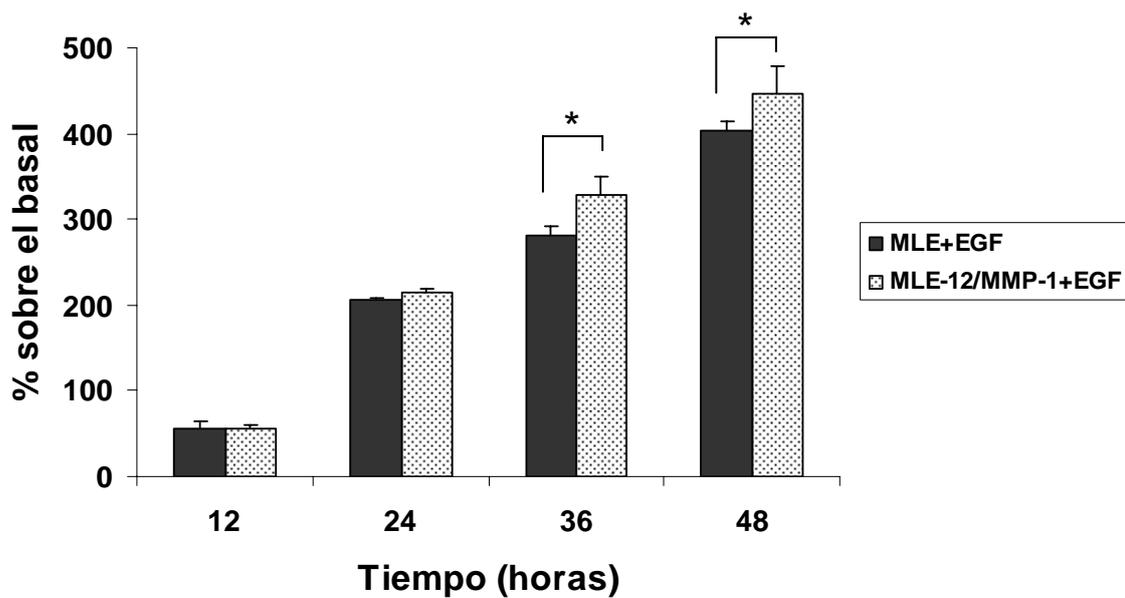


Fig.8 Tasa de crecimiento de células epiteliales de ratón propagadas en medio HITES suplementado con SFB al 2% más EGF [100 ng/ml], * $p < 0.05$.

Tabla 1. Porcentajes de proliferación de células epiteliales (MLE-12) y células MLE-12 transfectadas con MMP-1 humana (MLE-12/MMP-1), creciendo en medio HITES con y sin EGF.

	12 hrs	24 hrs	36 hrs	48 hrs
MLE-12	50 ± 8.3	197 ± 2.8	254 ± 11	300 ± 11
MLE-12/MMP-1	49 ± 5.2	204 ± 5.2	300 ± 20.7*	394 ± 33.6**
MLE-12 + EGF	55 ± 0.1	206 ± 5.6	281 ± 6.3	403 ± 11
MLE-12/MMP-1+ EGF	55 ± 7.7	214 ± 13.2	328 ± 7.8 [¶]	445 ± 10 [¶]

*p<0.05, **p<0.01 sin EGF; [¶]p<0.01 con EGF

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Hasta la fecha, los mecanismos moleculares que desencadenan una respuesta fibrosante en el pulmón aún no se conocen con precisión. En el caso de la fibrosis pulmonar idiopática se ha sugerido que ante un daño que causa el deterioro y ruptura del epitelio alveolar, ocurre un proceso de remodelación epitelial anormal que provoca la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y el depósito exagerado de matriz extracelular, que terminan por destruir la arquitectura pulmonar (1, 4, 5). En este contexto, la re-epitelización del epitelio alveolar que ha sido dañado es fundamental para que se pueda dar el proceso de remodelación y en él, la migración y la proliferación de las células alveolares tipo II son procesos necesarios para cubrir el área que fue dañada (7, 8, 60).

Existen evidencias de que la re-epitelización del epitelio involucra la participación de metaloproteasas de matriz extracelular. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Pilcher y col. (53), se observó que en la herida de piel los queratinocitos requieren de la colagenasa intersticial (MMP-1) para migrar y reparar la herida. Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado una inesperada sobre-regulación de la MMP-1 (55). Sin embargo, la MMP-1 se localiza

Tabla 1. Porcentajes de proliferación de células epiteliales (MLE-12) y células MLE-12 transfectadas con MMP-1 humana (MLE-12/MMP-1), creciendo en medio HITES con y sin EGF.

	12 hrs	24 hrs	36 hrs	48 hrs
MLE-12	50 ± 8.3	197 ± 2.8	254 ± 11	300 ± 11
MLE-12/MMP-1	49 ± 5.2	204 ± 5.2	300 ± 20.7*	394 ± 33.6**
MLE-12 + EGF	55 ± 0.1	206 ± 5.6	281 ± 6.3	403 ± 11
MLE-12/MMP-1+ EGF	55 ± 7.7	214 ± 13.2	328 ± 7.8 [¶]	445 ± 10 [¶]

*p<0.05, **p<0.01 sin EGF; [¶]p<0.01 con EGF

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Hasta la fecha, los mecanismos moleculares que desencadenan una respuesta fibrosante en el pulmón aún no se conocen con precisión. En el caso de la fibrosis pulmonar idiopática se ha sugerido que ante un daño que causa el deterioro y ruptura del epitelio alveolar, ocurre un proceso de remodelación epitelial anormal que provoca la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y el depósito exagerado de matriz extracelular, que terminan por destruir la arquitectura pulmonar (1, 4, 5). En este contexto, la re-epitelización del epitelio alveolar que ha sido dañado es fundamental para que se pueda dar el proceso de remodelación y en él, la migración y la proliferación de las células alveolares tipo II son procesos necesarios para cubrir el área que fue dañada (7, 8, 60).

Existen evidencias de que la re-epitelización del epitelio involucra la participación de metaloproteasas de matriz extracelular. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Pilcher y col. (53), se observó que en la herida de piel los queratinocitos requieren de la colagenasa intersticial (MMP-1) para migrar y reparar la herida. Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado una inesperada sobre-regulación de la MMP-1 (55). Sin embargo, la MMP-1 se localiza

fundamentalmente en células alveolares epiteliales y está ausente en los fibroblastos de las áreas fibróticas (47). No es claro el papel que la MMP-1 desempeña en las células epiteliales pero hemos hipotetizado que podría estar implicada en la migración de las células epitelio alveolares, tal como se ha sugerido ocurre con los queratinocitos en piel.

El presente trabajo fue diseñado con el fin de obtener una idea más clara del papel que desempeña la MMP-1 en células epitelio alveolar tipo II. Para ello, células epitelio alveolares tipo II de ratón (MLE-12) fueron transfectadas con la MMP-1 humana y se examinó la migración y la proliferación de estas células.

El análisis por PCR mostró un transcrito de aproximadamente 172 pb, correspondiente a la MMP-1 en las células que fueron transfectadas, lo cual indica que estas células de ratón contienen el transcrito de la colagenasa-1 humana. Adicionalmente, el estímulo con PMA indujo un aumento en la expresión de esta enzima, lo cual era de esperarse ya que se ha reportado que el PMA incrementa la transcripción de MMP-1 (61). Sin embargo, cuando se analizó por western blot para ver la expresión de la proteína, no se logró observar ninguna señal de las muestras tanto de medio condicionado como del lisado celular (aunque la foto del lisado no se muestra, el resultado fue exactamente el mismo), esto pudiera deberse a limitaciones de concentración, ya que como se puede observar en la fotografía del gel de medio condicionado, la expresión obtenida de la MMP-1 en el control positivo fue baja, comparado con la que se ha obtenido en nuestro laboratorio y la cual se sabe que los fibroblastos humanos hacen la MMP-1.

En este estudio nosotros observamos que después de realizar una herida in vitro, las células van cubriendo el área desnuda. Interesantemente, después de 48 horas de haber hecho la herida, las células que contenían el inserto de la

colagenasa-1 cubren un porcentaje mayor que aquellas que no fueron transfectadas. Así mismo, observamos que este fenómeno se incrementó cuando se adicionó el EGF a los cultivos, pero en éste caso, las células con MMP-1 cubrieron por completo la herida al término de 36 horas, mientras que las células sin MMP-1 no logaron cerrar la herida, incluso después de 48 horas. Estos resultados sugieren que la presencia de MMP-1 podría estar participando en la migración de las células, análogamente como ocurre con los queratinocitos en heridas de piel.

Estos resultados son congruentes con lo que se ha reportado en cuanto a la expresión de la MMP-1 la cual es sobre-regulada por varias citocinas incluyendo el EGF en varios tipos celulares, de igual modo activa muchas respuestas biológicas, incluyendo proliferación y diferenciación celular. Numerosos estudios han reportado que la activación del receptor del EGF permite incrementar la movilidad celular, en los cuales haciendo uso del EGF exógenamente, se ha encontrado un incremento en la re-epitelización durante la reparación de una herida (62).

El papel de las MMP's en la migración durante procesos de re-epitelización ha sido previamente hipotetizado, pero el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo no es comprendido totalmente. Existen antecedentes que sugieren que en la herida de piel, la asociación de la pro-MMP-1 con la integrina $\alpha_2\beta_1$ es requerida para que los queratinocitos migren sobre colágena tipo I (50). Otros estudios sugieren la participación de otras MMP's en el proceso de migración que ocurre durante el saneamiento de una herida. Por ejemplo, estudios *in vivo* e *in vitro* han reportado que la gelatinasa B (MMP-9) y la gelatinasa A (MMP-2) se expresan en células epitelio bronquiales durante la re-epitelización del epitelio respiratorio y

su actividad es esencial para la migración y la reparación de una herida (63,64). Adicionalmente, un reporte hecho por Sadowski y col. (37), muestra que la actividad de la MMP-19 es esencial durante la migración de queratinocitos.

Con el fin de sustentar el resultado obtenido, se llevó a cabo otro ensayo de migración celular usando para ello cámaras tipo Boyden cuya membrana estaba recubierta con colágena tipo I, esto debido a que la colágena I es uno de los sustratos de la MMP-1. En este ensayo utilizamos EGF como quimioatrayente ya que se sabe que EGF potencia la migración de células epiteliales (53,65). Nuestros resultados muestran que bajo estas condiciones, las células transfectadas con MMP-1 migran en mayor proporción que aquellas que no tienen el inserto. Estos resultados confirman que la presencia de MMP-1 en las células favorece la capacidad de migración de estas células.

Con el fin de determinar si el efecto de la MMP-1 en la reparación de la herida se debe sólo a que esta enzima incrementa la migración celular y no la división celular, se llevó a cabo un ensayo de proliferación. Los resultados obtenidos muestran que a 36 y 48 horas de cultivo con y sin EGF, las células que expresan la MMP-1 proliferan más que aquellas que no tienen la enzima, lo cual podría sugerir que la incorporación de la MMP-1 tiene un efecto directo sobre la división celular de estas células. Este resultado sugiere que en el ensayo de la herida, es muy probable que el efecto observado sea el resultado de la combinación del aumento en la migración y el aumento en la proliferación.

Hasta la fecha no se sabe con claridad cual es la asociación entre la MMP-1 y su efecto en la proliferación celular. Sin embargo, en un estudio reciente realizado por Limb y col. (25), se observó que la MMP-1 intracelular se puede encontrar asociada a mitocondrias y al núcleo celular, además de que los niveles de ésta

enzima varían de acuerdo al ciclo celular, siendo más abundante en la fase M lo cual podría sugerir que la acumulación de MMP-1 intracelular durante la metafase podría ayudar a la disociación temporal del núcleo, lo cual podría promover el crecimiento celular.

En conclusión, los resultados de este trabajo muestran que la expresión de la MMP-1 incrementa la migración y la proliferación de las células epiteliales (MLE-12) y sugieren que la MMP-1 podría desempeñar un papel importante durante el proceso de re-epitelización del epitelio alveolar en la fibrosis pulmonar idiopática.

REFERENCIAS

- 1.- Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Frontiers in Bioscience*. (2002) 7: d1743-1761.
- 2.- Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*. (2001) 134: 136-151.
- 3.- Smith R.E. Chemotactic cytokines mediate leukocyte recruitment in fibrotic lung disease. *Biol Signals* (1996) 5: 223-231.
- 4.- Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. (2002) 34: 1534-1538.
- 5.- Selman M, Pardo A. The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. Tying loose ends. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2003) 29: S93-S97.
- 6.- Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: misunderstandings between epithelial cells and fibroblasts? *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* (2004) 21: 165-172.
- 7.- Geiser T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury – a translational approach. *Swiss Med Wkly* (2003) 133: 586-590.
- 8.- Sugahara K, Tokumine J, Teruya K, and Oshiro T. Alveolar epithelial cells: differentiation and lung injury. *Respirology* (2006) 11: S28-S31.
- 9.- Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am J Pathol* (1996) 149: 845-52.

- 10.- Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. ***Am J Physiol*** (1998) 275: L1192-9.
- 11.- Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. ***Respir Res*** (2002) 3: 3.
- 12.- Stamenkovic I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. ***J Pathol*** (2003) 200: 448-464.
- 13.- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. ***Annu Rev Cell Dev Biol*** (2001) 17: 463-516.
- 14.- Perez-Tamayo R. Morphostasis: regulation of structure. ***Biol Estud Med Biol*** (1974) 145-161.
- 15.- Iozzo RV. Matrix proteoglycans: molecular design to cellular function. ***Annu Rev Biochem*** (1998) 76: 609-652.
- 16.- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. ***J Biol Chem*** (1999) 274: 21491-21494.
- 17.- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. ***Circ Res*** (2003) 92:827-839.
- 18.- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical applications. ***J Clin Oncol*** (2000) 18: 1135-49.
- 19.- Stöcker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Rüth FX, et al. The matzincins topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. ***Protein Sci*** (1995) 4: 823-40.

- 20.- Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. ***Curr Opin Cell Biol*** (2004) 16: 558-564.
- 21 .- Lagente V., Manoury B., Nénan S., Le Quément C., Martín-Chouly C. and Boicot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of of airway inflammation and remodeling ***Braz J Med Biol Res*** (2005) 38(10): 1521-30.
- 22.- Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. ***Curr Opin Cell Biol*** (1995) 7: 728-735.
- 23.- Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. ***Nat Rev Genet*** (2003) 4: 544-558.
- 24.- Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matriz metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. ***Int J Dev Biol*** (2004) 48: 411-424.
- 25.- Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, Khaw PT. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. ***Am J Pathol*** (2005) 166: 1555-1563.
- 26.- Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. ***Circulation*** (2002) 106: 1543-1549.
- 27.- Luo D, Mari B, Stoll I, Anglrd P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. ***J Biol Chem*** (2002) 277: 25527-25536.
- 28.- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. ***J Biol Chem*** (2002) 277: 207-214.

- 29.- Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. ***Int J Biochem Cell Biol*** (2005) 37: 283-288.
- 30.- Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. ***Biochem J*** (1995) 309: 299-306.
- 31.- McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-Cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. ***Am J Pathol*** (2003) 162: 1831-43.
- 32.- Uria JA, López-Otin C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency and activity. ***Cancer Res*** (2000) 60: 4745-4751.
- 33.- Park HI, Ni J, Gerkema FE, Liu D, Belozeroov VE, Sang QX. Identification and characterization of human endometase (matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. (2000) 275: 20540-20544.
- 34.- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. ***Nature Rev*** (2002) 2: 161-174.
- 35.- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. ***J Biol Chem*** (1997) 272: 2446-2451.
- 36.- Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. (1995) 375: 244-247.
- 37.- Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R. Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. ***Mol Biol Cell*** (2003) 14: 4569-4580.

- 38.- Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jahkola T, Suomela S, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. **J Invest Dermatol** (2002) 119: 14-21.
- 39.- Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. **Proc Am Thorac Soc** (2006) 3: 383-388.
- 40.- Chakraborti S, Mandal M, Das S, et al. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. **Mol Cell Biochem** (2003) 253: 269-285.
- 41.- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol Chem** (1997) 378: 151-160.
- 42.- Murphy G & Docherty A. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Am J of Respir Cell and Moll Biol** (1992) 7: 120-125.
- 43.- Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochem Biophys Acta** (2000) 1477: 267-283.
- 44.- Infeld MD. Cell-matrix interaction in gland development in the lung. **Exp Lung Res** (1997) 23: 161-9.
- 45.- Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases: matrix degradation and more. **Am J Respir Cell Mol Biol** (1999) 20: 1100-02.
- 46.- Gharaee-Kermani M, Phan SH. Role of cytokines and cytokine therapy in wound healing and fibrotic diseases. **Curr Pharm Des** (2001) 7: 1083-1103.
- 47.- Selman M, Ruíz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? **Am J Physiol** (2000) 279: L562-74.
- 48.- Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1 independent pathway of IL-1 beta processing. **J Immunol** (1998) 161: 3340-3346.

- 49.- Pardo A, Selman M, Ramírez R, Ramos C, Montaña M, Stricklin G, Raghu G. Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs. **Chest** (1992) 102: 1085-1089.
- 50.- Dumin JA, Dickeson SK, Stricker TP, Bhattacharyya-Pakrasi M, Roby JD, Santoro SA, Parks WC. Pro-collagenase-1 (Matrix Metalloproteinase-1) binds the $\alpha_2\beta_1$ integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. **J Biol Chem.** (2001), 276: 29368-29374.
- 51.- Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Lopez JM, Alvarez J, Sanchez LM, Quesada V, Bordallo J, Murphy G, López-Otin C. Identification and enzymatic characterization of two divergin murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryonic implantation. **J Biol Chem** (2001), 276: 29368-29374.
- 52.- McCawley LJ. & Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore. **Curr Opin Cell Biol** (2001) 3: 534-540.
- 53.- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, and Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. **J Cell Biol** (1997) 137: 1445-1457.
- 54.- D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, Berg RA, Chada K. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. **Cell** (1992) 71:955-961.
- 55.- Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. **Proc Natl Acad Sci USA** (2002) 99: 6292-6297.

- 56.- McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. **Am J Pathol.** (2003); 162(6):1831-43.
- 57.- Wikenheiser KA, et al. Simian virus 40 large T antigen directed by transcriptional elements of the human surfactant protein C gene produces pulmonary adenocarcinomas in transgenic mice. **Cancer Res** (1992) 52: 5342-5352.
- 58.- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) Cap: 1.7, 1.21.
- 59.- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Annal Biochem** (1987) 162: 156-159.
- 60.- Selman M, and Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. **Proc Am Thorac Soc** (2006) 3: 364-372.
- 61.- Pardo A, Ridge K, Uhal B, Sznajder JI, Selman M. Lung alveolar epithelial cells synthesize interstitial collagenase and gelatinases A and B in vitro. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** (1997) 29:901-910.
- 62.- Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Epidermal growth factor affects the synthesis and degradation of type I collagen in culture human dermal fibroblasts. **Matrix Biol.** (2006) 25: 202-212.
- 63.- Kunugi S, Fukuda Y, Ishizaki M, Yamanaka N. Role of MMP-2 in alveolar epithelial cell repair after bleomycin administration in rabbits. **Lab Invest.** (2001);81(9):1309-18.

64.- Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E, Birembaut P, Tournier JM. Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. **J Cell Physiol.** (1996); 166(2):413-26.

65.- Dorscheid DR, Wojcik KR, Yule K, White SR. Role of cell surface glycosylation in mediating repair of human airway epithelial cell monolayers. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** (2001); 281(4):L982-92.