



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MMP-7, MMP-8,
MMP-14, MMP-19 Y TIMP-1 EN EL MODELO DE
FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA POR
BLEOMICINA EN RATÓN (*Mus musculus*)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALFREDO LOZANO BOLAÑOS

DIR. DE TESIS:

DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ



2008



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.

"Es mejor fracasar en el intento de ser original que obtener éxito imitando a los otros"

Mijaíl Málishev

Agradecimientos

A mi familia por todo el apoyo que me ofrecieron durante el trayecto de mi carrera, y por haberme dado los recursos necesarios para acabarla.

También quiero agradecer a Remedios Ramírez Rangel (Reme) y a Claudia Segal porque con ustedes aprendí desde las cosas más básicas en el laboratorio, entre otras cosas, que aún me siguen siendo de gran utilidad.

A Sandra Cabrera Benítez que además de haber sido mi profesora eres mi amiga y te admiro bastante porque eres una persona muy trabajadora, dedicada que realmente te interesa lo que haces, que logras lo que te propones y que además durante el transcurso de este trabajo siempre estuviste apoyándome y ayudándome cuando me surgían dudas. En verdad aprendí muchas cosas de ti y gracias por haber creído en mí

A la Dra. Annie Pardo Semo y al Dr. Moisés Selman Lama a quienes admiro, ya que son grandes investigadores, y me dieron la oportunidad de incorporarme a este grupo trabajo.

A mis amigos: Karla, Juan, Alexander, Cisteil, Yoli, Esthela, Alejandra, Yolitzi, etc. con quienes me divertí dentro y fuera de la Facultad.

A Jorge e Isabel del laboratorio de Bioquímica; y a Karina y Carolina del INER por aconsejarme y darme ideas, además de escucharme.

A la UNAM, una de las mejores universidades y al INER, por brindarme mi formación académica y la infraestructura para la realización de este trabajo.

Índice

Lista de Abreviaturas

Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
1.1 Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	2
1.2 Matriz Extracelular (MEC)	5
1.3 Metaloproteasas de Matriz (MMPs).....	6
1.4 Clasificación de las MMPs.....	7
1.5 Diversidad Estructural de las MMPs.....	7
1.6 Regulación de las Metaloproteasas de Matriz.....	12
1.6.1 Regulación Transcripcional	12
1.6.2 Activación de la pro-enzima.....	13
1.6.3 Inhibidores endógenos	13
1.7 MMPs y Fibrosis Pulmonar	14
1.7.1 MMP-7 en FPI.....	14
1.7.2 MMP-1 en FPI.....	15
1.7.3 MMP-2 y MMP-9 en FPI	16
1.7.4 TIMP-1 en FPI.....	17
1.8 Modelo de Bleomicina para el Estudio de la Fibrosis Pulmonar	18
II. Objetivo General.....	20
2.1 Objetivos particulares.....	20
III. Metodología	21
3.1 Población de Estudio	21
3.2 Extracción de RNA	21
3.3 Síntesis de cDNA por Transcripción Inversa (RT-PCR)	23
3.4 PCR.....	24
3.5 Purificación de los productos de los geles de agarosa (gene-clean).....	25

3.6 Elaboración de Curvas Estándar para la cuantificación de la expresión génica por RT-PCR Cuantitativo (q-PCR)	26
3.7 Fundamentos teóricos de la cuantificación por PCR en tiempo real.....	28
3.8 PCR Cuantitativo (q-PCR)	30
3.9 Análisis estadístico.....	30
IV. Resultados	31
4.1 Análisis de los productos de RT-PCR.....	31
4.2 PCR Cuantitativo.....	31
4.2.1 MMP-7.....	31
4.2.2 MMP-8.....	33
4.2.3 MMP-14 (MT1-MMP).....	34
4.2.4 MMP-19.....	36
4.2.5 TIMP-1.....	38
V. Discusión.....	40
VI. Conclusión.....	45
VII. Bibliografía.....	46

Lista de Abreviaturas

aa.	Aminoácido
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
FP	Fibrosis Pulmonar
NII	Neumonías Intersticiales Idiopáticas
EPI	Enfermedades Pulmonares Intersticiales
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteasa de Matriz Extracelular <i>(del inglés Matrix Metalloproteinase)</i>
MT-MMP	Metaloproteasa de Matriz tipo Membrana <i>(del inglés Membrane Type-Matrix Metalloproteinase)</i>
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante β <i>(del inglés Transforming Growth Factor Beta)</i>
RNA	Ácido ribonucleico <i>(del inglés Ribonucleic Acid)</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico <i>(del inglés Desoxyribonucleic Acid)</i>
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero <i>(del inglés messenger Ribonucleic Acid)</i>
RT-PCR	Transcripción Reversa-PCR <i>(del inglés Reverse Transcription-PCR)</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa <i>(del inglés Polymerase Chain Reaction)</i>
TIMP	Inhibidor Tisular de Metaloproteasas <i>(del inglés Tissue Inhibitor of Metalloproteinases)</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario <i>(del inglés complement Desoxyribonucleic Acid)</i>
EDTA	Ácido Etilendiamintetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico <i>(del inglés Epidermal Growth Factor)</i>
KGF	Factor de Crecimiento de Queratinocitos <i>(del inglés Keratinocyte Growth Factor)</i>
FGFs	Factores de Crecimiento de Fibroblastos <i>(del inglés Fibroblast Growth Factors)</i>
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial <i>(del inglés Vascular Endotelial Growth Factor)</i>
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α <i>(del inglés Tumor Necrosis Factor alpha)</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
pb.	Pares de bases
q-PCR	RT-PCR Cuantitativa

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar progresiva y usualmente letal de etiología desconocida, caracterizada por la proliferación de fibroblastos y la remodelación anormal de la matriz extracelular (MEC), que conlleva a una distorsión irreversible de la arquitectura pulmonar. [2, 5] La matriz extracelular es una estructura dinámica que desempeña un papel crucial en la arquitectura y homeostasis pulmonar, proporcionando la mayoría del andamiaje necesario para la regulación del comportamiento celular. El recambio bien controlado de la matriz extracelular es crucial en el mantenimiento de la morfostasis pulmonar. Por lo tanto, la fibrosis pulmonar se puede conceptualizar mínimamente como el resultado de la pérdida de la regulación de la síntesis y degradación de moléculas de la matriz extracelular. [13] Los mecanismos moleculares detrás de esta remodelación anormal son poco comprendidos, pero involucra, al menos en parte, a dos familias de proteínas: las Metaloproteasas de Matriz (MMPs) y los Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas de Matriz (TIMPs). [2-5] Ha sido reportado que diferentes MMPs y TIMPs están altamente expresados en la FPI, entre ellos la MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 y TIMP-1. [13] Por otro lado es importante mencionar que uno de los modelos experimentales más utilizado para el estudio de la fibrosis pulmonar es el modelo de bleomicina, el cual ha sido ampliamente caracterizado. [17-18] El objetivo del presente trabajo de tesis fue analizar la expresión de MMP-7, MMP-8, MMP-14, MMP-19 y TIMP-1. Utilizando el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, se estudió el curso temporal hasta un periodo de 4 meses y se exploró por PCR en tiempo real la expresión de éstas enzimas.

I. Introducción

1.1 Fibrosis Pulmonar Idiopática.

Las neumonías intersticiales idiopáticas (NII) son un grupo de enfermedades pulmonares intersticiales (EPI) de causa desconocida. ^[1] La fibrosis pulmonar idiopática (FPI, también llamada alveolitis fibrosante criptogénica) es la forma más común de las NII y es la más agresiva de todas las EPI, representa una afección pulmonar crónica, progresiva y usualmente letal. ^[2-4] No tiene predilección por raza o etnia, y usualmente se presenta en personas entre 50 – 70 años de edad. ^[4]

Con respecto a la secuencia de eventos patogénicos, generalmente se está de acuerdo en que las EPI comienzan por una lesión al epitelio que provoca el desarrollo de una respuesta inflamatoria, que si no se resuelve adecuadamente, es seguida por la activación y proliferación de fibroblastos y finalmente por la acumulación exagerada de proteínas de la matriz extracelular (MEC). ^[3]

El daño al epitelio alveolar del pulmón constituye un factor de suma importancia en el desarrollo de esta enfermedad. El epitelio alveolar está constituido por dos células epiteliales distintas; cerca del 90% está cubierto por células epiteliales tipo 1, planas y enormemente expandidas. La geometría de estas células es ideal para el intercambio gaseoso. El 10% restante de la superficie alveolar es cubierto por neumocitos tipo 2 cuboidales que se proyectan dentro del lumen frecuentemente ocupando un nicho en las esquinas de los alveolos. ^[3, 41]

Anteriormente se asumía que la inflamación era un evento crucial que precedía el desarrollo de la fibrosis pulmonar. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la inflamación juega un papel importante para la mayoría de las EPI pero no para la FPI, en la cual la fibrosis parece tener un proceso patológico independiente de la inflamación, ya que diferentes líneas de evidencia sugieren fuertemente que la inflamación no es un evento patogénico importante en la FPI. La evidencia incluye la presencia de alveolitis leve/moderada, similar tanto en la etapa temprana como en la etapa tardía de la enfermedad, y la falta de respuesta al tratamiento con antiinflamatorios potentes a largo plazo. ^[1] Además, algunas enfermedades humanas y

modelos experimentales han puesto en evidencia que es posible presentar fibrosis independientemente de la inflamación. [2-5]

Esta propuesta mencionada anteriormente, asume que la FPI podría deberse a microlesiones en el epitelio alveolar junto con la activación de las células epiteliales alveolares y una reparación anormal del daño. Ya que durante la reparación normal de una herida de la piel, las células epiteliales se mueven rápidamente a través de la herida para restablecer la cubierta cutánea. Durante el proceso posterior de reparación tisular, los fibroblastos se dirigen hacia el espacio de la lesión donde se transforman en miofibroblastos, contraen la herida y sintetizan nueva MEC. Después de eso, se ha propuesto que la muerte celular programada debe ocurrir para mediar el decremento de las células mesenquimales. Finalmente, las células epidérmicas se diferencian para restablecer la barrera de permeabilidad. De una manera similar, el complejo proceso de la reparación normal del pulmón después de una lesión requiere de los esfuerzos en colaboración, de diferentes linajes celulares, que deben incluir, por una parte, la migración, proliferación y diferenciación de células epiteliales y por otra parte la transformación en miofibroblastos, y la apoptosis de éstos. En afecciones fibróticas progresivas incluyendo la FPI, sin embargo, un grupo de evidencias recientes sugiere que ocurre lo opuesto, incrementa la apoptosis de las células epiteliales y toma lugar un decremento de la apoptosis de fibroblastos/miofibroblastos. [5]

Un marcado descontrol en la integridad del epitelio alveolar con la presencia de diferentes fenotipos alterados es una característica distintiva en pulmones con FPI. Estos cambios morfológicos también van acompañados por modificaciones en la expresión de citoqueratinas específicas que reflejan especialización funcional, diferenciación y alteraciones patológicas, sugiriendo que no solo las células epiteliales son alteradas en su forma, sino que también en su estado de diferenciación y función. Además la disfunción epitelial podría aumentar la diapédesis de los componentes sanguíneos que en cambio aumentan la tensión superficial en el espacio alveolar, permitiendo la aposición y la fusión de las membranas basales expuestas y consecuentemente causando el colapso alveolar y fibrosis. [5]

Por lo tanto, uno de los eventos críticos en el curso de la FPI es un profundo defecto en el desarrollo de una re-epitelización apropiada. La membrana basal es una estructura compleja y juega un papel dinámico en el mantenimiento de la integridad y diferenciación del epitelio alveolar y su alteración es importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Se sabe que las células epiteliales alveolares son capaces de producir diversas moléculas de la MEC (por ejemplo: colágena tipo IV, laminina, fibronectina, perlecano, entactina y trombospondina; directamente relacionadas a la formación de su propia membrana basal). En etapas tardías de fibrosis, las membranas basales epiteliales se encuentran frecuentemente onduladas y alteradas, y los fibroblastos migran a través de huecos en las membranas basales epiteliales y continúan proliferando y produciendo MEC en los espacios alveolares. [5]

Una característica esencial en el desarrollo de la fibrosis pulmonar es la activación de fibroblastos, que es seguida por la remodelación anormal de la MEC y la subsiguiente destrucción de la arquitectura pulmonar. La proliferación y activación de los fibroblastos extensamente dispersos a través del parénquima pulmonar, usualmente preceden a la acumulación de moléculas de la MEC en los alveolos dañados, y se considera un paso clave en la transformación de una afección potencialmente reversible en una progresiva e irreversible. [3] La proliferación de los fibroblastos ocurre en un intento por reparar los alveolos dañados. [6] Ciertamente, la cantidad de focos de fibroblastos/miofibroblastos son considerados el principal factor de pronóstico en pacientes con FPI. [3]

De acuerdo con la información generada recientemente se propone que los fibroblastos primero adquieren un fenotipo migratorio, después un fenotipo proliferativo, y finalmente un fenotipo profibrótico de miofibroblasto, durante el cual, producen abundantes cantidades de MEC, principalmente colágenas fibrilares, provocando la alteración de la membrana basal y la apoptosis de las células epiteliales alveolares, perpetuando el daño y evitando la adecuada re-epitelización. El resultado final es el depósito excesivo de matriz extracelular junto con la destrucción de las unidades alveolo-capilares y la formación de "panales de abeja" (tabiques engrosados de colágena que rodean a los espacios aéreos limitados por el epitelio bronquial). [3]

1.2 Matriz Extracelular (MEC).

Los tejidos no están formados únicamente por células. Una buena parte de su volumen lo constituye el espacio extracelular, el cual está ocupado por una intrincada red macromolecular que constituye la matriz extracelular. [7]

La MEC está compuesta por polisacáridos y proteínas muy diversas, secretados localmente y ensamblados en una red compleja en íntima asociación con la superficie celular. En el tejido conjuntivo, la matriz es más abundante que las células, rodeándolas completamente y determinando las propiedades físicas del tejido. Los tejidos conjuntivos constituyen el esqueleto arquitectónico del cuerpo de los vertebrados, pero su cantidad presente en los diferentes órganos varía considerablemente. [7]

Las variaciones en cuanto a la participación relativa de los diferentes tipos de macromoléculas de la matriz así como los patrones de organización de estas macromoléculas en la MEC dan lugar a una sorprendente diversidad de formas, cada una de las cuales está altamente adaptada a los requerimientos funcionales de cada tejido en particular. En la interfase entre un epitelio y un tejido conjuntivo, la matriz forma una lámina basal, estructura extremadamente delgada pero que juega un importante papel en el control del comportamiento celular. [7]

La MEC desempeña un papel mucho más activo y complejo en la regulación del comportamiento de las células que entran en contacto con ella, afectando a su desarrollo, su migración, su proliferación, su forma y su función. La MEC presenta una compleja composición molecular que corresponde a estas funciones. [7]

Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular proceden, fundamentalmente, de una secreción celular de carácter local. En la mayor parte de los diferentes tipos de tejido conjuntivo, estas macromoléculas son secretadas fundamentalmente por los fibroblastos. [7]

Las dos clases principales de macromoléculas que conforman la matriz son:

- 1) Cadenas de polisacáridos del tipo de los glucosaminoglucanos (GAG), los cuales normalmente se hallan unidos a proteínas mediante enlaces covalentes en forma de proteoglucanos.

- 2) Proteínas fibrosas, pertenecientes a dos tipos funcionales: las de características fundamentalmente estructurales (por ejemplo, colágena y elastina) y las adhesivas (por ejemplo, fibronectina y laminina).

La MEC es una estructura dinámica que desempeña un papel crucial en la arquitectura y homeostasis pulmonar, proporcionando la mayoría del andamio necesario para la regulación del comportamiento celular. La MEC del parénquima pulmonar comprende diferentes moléculas, incluyendo colágenas (principalmente tipo I y III), elastina, proteoglicanos y fibronectina. Mientras estructuras especializadas de la MEC como las membranas basales del epitelio alveolar y del endotelio están constituidas junto con otras proteínas por lamininas, entactina, y colágena tipo IV. El recambio bien controlado de la MEC es crucial en el mantenimiento de la morfostasis pulmonar. Por lo tanto, la fibrosis pulmonar se puede conceptualizar mínimamente como el resultado de la pérdida de la regulación de la síntesis y degradación de moléculas de la MEC. [7]

1.3 Metaloproteasas de Matriz (MMPs).

La familia de enzimas metaloproteasas de matriz (MMPs), también llamadas matrixinas, son endopeptidasas dependientes de zinc. [8-9] Y gracias a la disponibilidad de la secuencia completa del genoma humano se ha podido definir el grupo que comprende a las MMPs producidas por las células humanas. [10] Por lo tanto, estudios genómicos recientes han revelado que existen 24 genes (incluyendo al gen 23 que se encuentra duplicado), que codifican para los 23 miembros de las MMPs. [8-12] (Ver Tabla 1) La principal función de las MMPs es la degradación de moléculas de la MEC del tejido. No obstante, se ha constatado que el rompimiento de moléculas de la MEC o moléculas de la superficie celular altera las interacciones célula-matriz y célula-célula, participando además en la liberación de factores de crecimiento que están unidos a la MEC, permitiendo que estos estén disponibles y puedan interactuar con sus receptores específicos. Además, un número de moléculas que no pertenecen a la MEC son también, sustratos potenciales de las MMPs. [8-15]

1.4 Clasificación de las MMPs.

Antes de que se conociera la secuencia completa del genoma humano, se acostumbraba dividir a las MMPs en: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMPs tipo membrana (MT-MMP) y otras; en base en la organización de los dominios y especificidad al sustrato. ^[10] También fue adoptado un sistema de numeración secuencial, vagamente basado en el orden de descubrimiento de cada MMP. ^[8] Sin embargo, recientemente se ha analizado el diseño estructural de estas enzimas, lo que ha permitido un nuevo sistema de clasificación basado en la estructura de las MMPs en vez de hacerlo por su especificidad al sustrato: MMPs arquetípicas, matrilisinas, gelatinasas y MMPs activadas en el sitio furina ^[10] (ver Tabla 1).

1.5 Diversidad estructural de las MMPs.

La mayoría de las MMPs consisten de un péptido señal que dirige la secreción de estas enzimas fuera de la célula, un propéptido de aproximadamente 80 aminoácidos, que mantiene a la enzima en estado de latencia; un dominio catalítico altamente conservado de aprox. 170 aminoácidos (aa), un péptido de unión (*linker*) de longitud variable (también llamada región bisagra) y un dominio hemopexina C-terminal (Hpx) de cerca 200 aa., que contribuye en la especificidad al sustrato y con interacciones con inhibidores endógenos. ^[9, 11-12] (ver Figura 1)

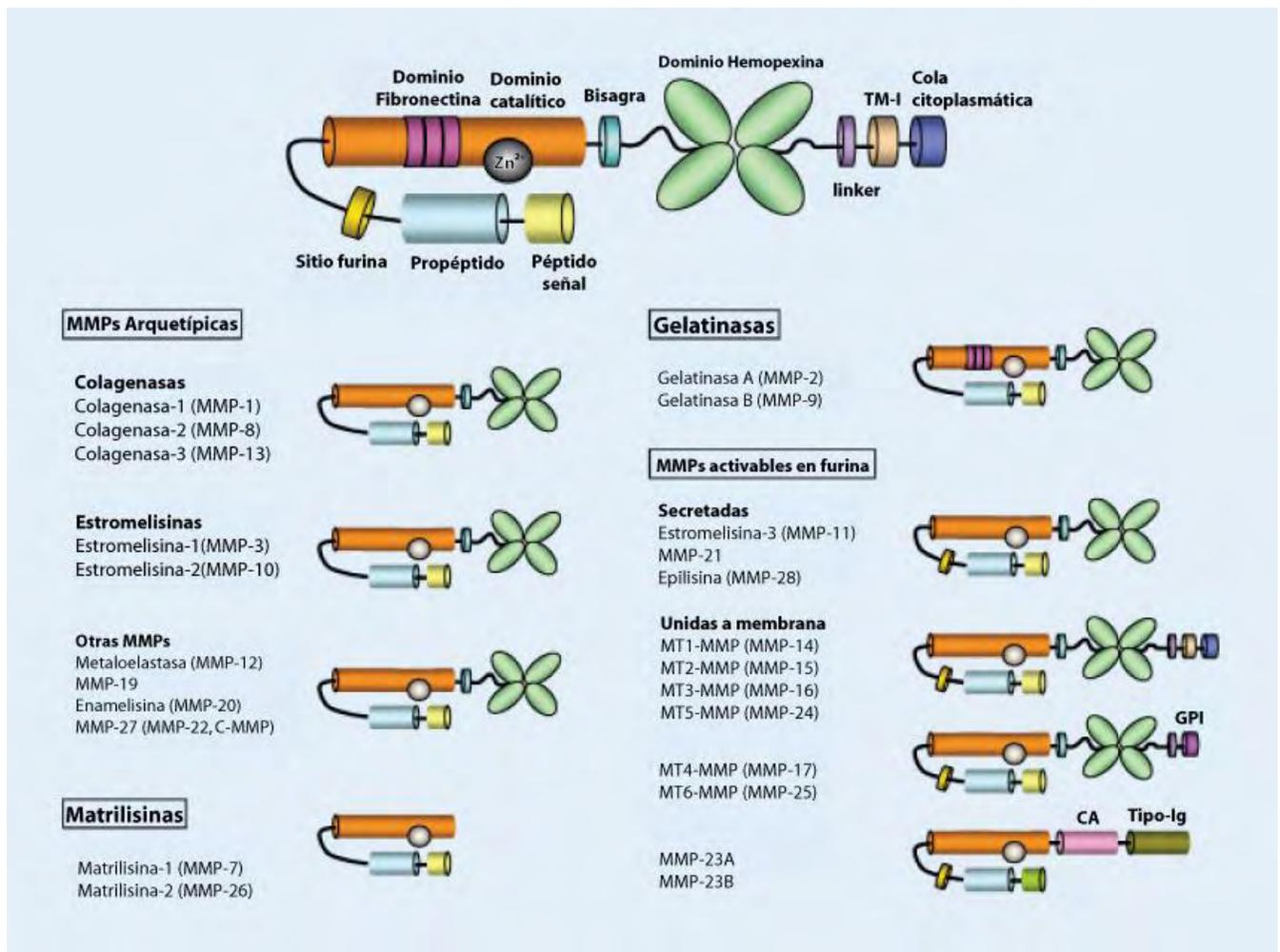


Figura 1. Diversidad de MMPs de humano. Clasificación estructural de las MMPs basándose en la organización de sus dominios. Figura tomada y modificada de Folgueras AR (2004). [10]

El motivo de unión a zinc HEXXHXXGXXH en el dominio catalítico, y el motivo "switch de cisteína" PRCGXPD en el propéptido son etiquetas estructurales comunes, donde 3 histidinas coordinan en el motivo de unión a zinc y la cisteína en el propéptido coordina al zinc catalítico. Esta coordinación Cys-Zn²⁺ mantiene a la pro-MMP inactiva, previniendo la unión de una molécula de agua, esencial para la catálisis, con el átomo de zinc. Por lo tanto ocurre la activación cuando esta unión es químicamente interrumpida. [9, 11-12]

El dominio catalítico también contiene una metionina conservada, formando un “Met-turn” ocho residuos después del motivo de unión a zinc, que mantiene la integridad del sitio de unión a zinc. [9]

MMPs arqueóticas. Están organizadas prácticamente como se mencionó anteriormente: un dominio estructural catalítico con un sitio conservado de unión a zinc. Incorporado en este sitio, hay un péptido señal que destina a la proteína al retículo endoplasmático, un propéptido amino terminal que mantiene al zimógeno inactivo hasta que sea activado por proteólisis, y un dominio hemopexina carboxilo terminal. Este diseño arqueótico de las MMPs está presente en el subgrupo de proteasas secretadas, compuestas por las tres colagenasas humanas (MMP-1, MMP-8, y MMP-13), las dos estromelinas (MMP-3 y MMP-10), y cuatro MMPs adicionales con características estructurales únicas (MMP-12, MMP-19, MMP-20, y MMP-27). [10]

Matrilisinas. Además de la conformación arqueótica, las dos matrilisinas (MMP-7 y MMP-26) carecen del dominio hemopexina. [9-10]

Gelatinasas. Las dos gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) incorporan tres módulos tipo II de fibronectina que proporciona un dominio de unión a colágena compacto. [10]

MMPs activadas en el sitio furina. Además de estas MMPs secretadas, hay seis MMPs tipo membrana (MT-MMPs) localizadas en la superficie celular a través de un dominio transmembranal C-terminal (MT1-, MT2-, MT3-, y MT5-MMP) o ancladas por GPI (glicosilfosfatidilinositol) (MT4- y MT6-MMP). Las MT-MMPs también tienen una inserción adicional de residuos básicos entre el propéptido y el dominio catalítico, que es roto por proteasas serina tipo furina permitiendo la activación intracelular de las proenzimas. Este sitio de ruptura tipo furina también está presente en tres MMPs de secreción (MMP-11, MMP-21 y MMP-28) que no encajan en ninguno de los subgrupos anteriores y dos MMPs transmembranales inusuales (MMP-23A y MMP-23B), que están ancladas a través de un segmento N-terminal y muestran una secuencia de aminoácidos idéntica, a pesar, de ser codificadas por 2 genes humanos distintos. [10]

Tabla 1. Metaloproteasas de Matriz (MMPs)

Proteasa	Número de MMP	Localización cromosómica (humano)	Sustratos de la MEC	Sustratos bioactivos
MMPs Arquetípicas				
Colagenasa-1; colagenasa intersticial	MMP-1	11q22-q23	Colágenas nativas tipo: III>II, VII, X; Gelatina, Agregano, Link protein, Entactina, Tenascina, Perlecana.	MCP-1, MCP-3, MCP-4, Stromal cell-derived factor (SDF), Pro-1L-1 β , 1L-1- β , IGF-BP-2, IGF-BP-3, Perlecana, Pro-TNF- α , Pro-MMP-1, Pro-MMP-2, α 1-proteinase inhibitor, α 1-antichymotrypsin, α 2-macroglobulin.
Colagenasa-2; colagenasa de neutrófilo.	MMP-8	11q21-q22	Colágenas nativas tipo: I>II>III, VII, X; Gelatina, Entactina, Agregano, Tenascina.	MCP-1, Pro-TNF- α , L-selection, IGF-BP, Pro-MMP-8, α 1-proteinase inhibitor, α 2-macroglobulina.
Colagenasa-3	MMP-13	11q22.3	Colágenas nativas tipo: II>III>I, VII, X; Gelatina, Entactina, Tenascina, Agregano.	MCP-3, SDF, Pro-TNF- α , Pro-MMP-9, Pro-MMP-13, α 1-antichymotrypsin, α 2-macroglobulina.
Estromelisin-1; proteoglicanasa.	MMP-3	11q23	Agregano, Laminina, Fibronectina, Regiones no en triple hélice de colágena nativa tipos: II, III, IV, V, IX, X, XI; Gelatina, Entactina, Perlecana, Decorina, Tenascina, Vitronectina, Fibrina/fibrinógeno, Link protein, Elastina.	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, SDF, Pro-TNF- α , L-selectina, Pro-HB-EGF, Pro-IL-1 β , Perlecana, Decorina, Plasminogeno, E-caderina, IGF-BP-3, Pro-MMP-1, Pro-MMP-3, Pro-MMP-7, Pro-MMP-8, Pro-MMP-9, Pro-MMP-13, α 1-proteinase inhibitor, α 1-antichymotrypsin, α 2-macroglobulin.
Estromelisin-2	MMP-10	11q22.3-q23	Gelatina tipo I, III, IV, V; Fibronectina, Proteoglicano.	Pro-MMP-1, Pro-MMP-8, Pro-MMP-10.
Metaloelastasa; elastasa de macrófago.	MMP-12	11q22.2-q22.3	Elastina, Fibronectina, Laminina, Proteoglicano, Fibrina/fibrinogeno, (proteína básica de mielina)	Plasminógeno, Pro-TNF- α , α 1-proteinase inhibitor.
RASI; Estromelisin-4.	MMP-19	12q14	Colágena nativa tipo IV, Laminina, Fibronectina, Tenascina, Entactina, Agregano, COMP, Fibrina/Fibrinógeno.	
Enamelisina	MMP-20	11q22.3	Amelogenina, COMP, Agregano.	
	MMP-27	11q24	Sustratos no definidos	
Matrilisinas				
Matrilisina-1; PUMP-1.	MMP-7	11q21-q22	Fibronectina, Laminina, Segmentos no helicoidales de colágenas nativas tipo IV, V, IX, X, XI; Gelatina, Agregano, Entactina, Tenascina, Vitronectina, Fibrina/fibrinógeno.	Pro- α -defensina, Cell surface bound Fas-L, Pro-TNF- α , E-caderina, β 4 integrina, Plasminógeno, Decorina, Pro-MMP-1, Pro-MMP-2, Pro-MMP-7, Pro-MMP-9, α 1-proteinase inhibitor, α 2-macroglobulin.

Matrilisina-2; endometasa.	MMP-26	11p15	Colágena nativa tipo IV, Gelatina, Fibronectina, Fibrina/Fibrinogeno.	IGFBP-1, Pro-MMP-9, α 1-proteinase inhibitor.
Gelatinasas				
Gelatinasa A; gelatinasa de 72-kDa; colagenasa tipo IV de 72-kDa.	MMP-2	16q13	Colágenas desnaturalizadas (gelatina), Colágenas nativas tipo: I, IV, V, VII, X, XI; Elastina, Fibronectina, Laminina-5, Agregano, Brevican, Neurocan, BM-40, Decorina, Vitronectina.	SDF, MCP-3, Pro-TGF- β 1, Pro-TNF- α , Pro-IL-1 β , IGFBP-3, IGFBP-5, FGFR-1, Big endothelin-1, Pregnancy zone protein, Sustancia P, Decorina, IGBP, Galectin-3, Pro-MMP-1, Pro-MMP-2, Pro-MMP-13, α 1-proteinase inhibitor, α 2-macroglobulina.
Gelatinasa B; gelatinasa de 92-kDa.	MMP-9	20q11.2-q13.1	Colágenas desnaturalizadas (gelatina), Colágenas nativas tipo: I, IV, V, VII, X, XI; Elastina, Fibronectina, Laminina, Agregano, Link protein, Vitronectina.	SDF, Pro-IL-8, CTAP-III/NAP-2, GRO α , PF-4, Pro-TNF- α , Pro-TGF- β 1, Pro-IL-1 β , Cell-surface IL-2R α , FGF-R1, Plasminógeno, Galectin-3, Pro-MMP-2, Pro-MMP-9, Pro-MMP-13, α 1-proteinase inhibitor, α 2-macroglobulina.
MMPs activables en furina				
Estromelisinasa-3	MMP-11	22q11.2	Fibronectina, Laminina, Agregano.	IGFBP-1, α 1-proteinase inhibitor, α 2-macroglobulina.
--	MMP-21		Sustratos no definidos	
Epilisinasa	MMP-28	17q11.2	Sustratos no definidos	
MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12	Colágenas nativas tipo: I, II, III; Gelatina, Fibronectina, Vitronectina, Agregano.	MCP-3, SDF, Cell-surface CD44, Cell-surface tissue transglutaminase (tTG), Pro-TNF- α , Pro-MMP-2, Pro-MMP-13, α 1-proteinase inhibitor, α 2-macroglobulina.
MT2-MMP	MMP-15	16q13-q21	Proteoglicano.	Pro-MMP-2, Cell-surface bound tTG, Pro-TNF- α .
MT3-MMP	MMP-16	8q21	Colágena nativa tipo III, Fibronectina.	Pro-MMP-2, Cell-surface bound tTG, Pro-TNF- α .
MT5-MMP	MMP-24	20q11.2	Fibronectina, Proteoglicanos, Gelatina.	Pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	12q24.3	Gelatina, Fibrina/fibrinógeno.	Pro-MMP-2, Pro-TNF- α .
MT6-MMP; leucolisina.	MMP-25	16p13.3	Colágena nativa tipo IV, Gelatina, Fibronectina, Proteoglicanos (DSPG, CSPG), Laminina-1, Fibrina/fibrinógeno.	Pro-MMP-2, Pro-MMP-9, α 1-proteinase inhibitor.
CA-MMP	MMP-23	1p36.3	Gelatina	

1.6 Regulación de las Metaloproteasas de Matriz.

A pesar de la complejidad de la regulación de las MMPs, se pueden reconocer tres niveles principales de control endógeno: transcripción génica, activación de la proenzima, e inhibición de la actividad enzimática. Algunos mecanismos adicionales por los que la actividad de las MMPs es controlada involucra la regulación de la estabilidad del RNAm, la eficiencia traduccional, compartimentalización, secreción de la enzima, reclutamiento en la superficie celular, sustratos blanco, endocitosis y degradación intracelular, y rasurado de la superficie celular o *shedding* en el caso de las MT-MMPs. [13] Colectivamente, estos mecanismos deben confinar la actividad de las MMPs a aquellos sitios donde es necesaria biológicamente. En general, los niveles de expresión de las MMPs en los tejidos humanos de adulto, son usualmente bajos, en estado fisiológico, y con algunas excepciones, su producción y actividad son mantenidas a niveles indetectables virtualmente. En cambio, su expresión se eleva cuando existe un reto para el sistema, como la curación de heridas, reparación o procesos de remodelación en tejidos enfermos, e incluso en varios tipos celulares crecidos en cultivos. [10, 13]

1.6.1 Regulación transcripcional.

La expresión de las MMPs, es específica para los distintos tipos de células y tejidos, varía tanto espacialmente como temporalmente y es compleja; hay diversos mecanismos por los que las células regulan la expresión de las MMPs. Su expresión puede ser inducida por varias señales, como citocinas y factores de crecimiento incluyendo interleucinas e interferones, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), diversos factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), etc. Además, la expresión de varias MMPs puede ser regulada por señales derivadas de integrinas, proteínas de la MEC, estrés físico, y cambios en la morfología celular. [8, 10, 13]

Muchos de los promotores de las MMPs son similares y de hecho, comparten diversos elementos cis. La mayoría de los promotores de las MMPs tienen una caja TATA

aproximadamente a -30 pb (relativo al sitio de inicio de la transcripción) y un sitio de unión a AP-I aproximadamente a -70 pb. [16]

1.6.2 Activación de la pro-enzima.

Las MMPs son sintetizadas como zimógenos, y su estado de latencia es mantenido por el grupo sulfhidrilo (SH) no acoplado de la cisteína cerca del carboxilo terminal del dominio propéptido. Por lo tanto, la activación de las pro-MMPs representa otro paso en la regulación de la actividad de las MMPs. A pesar de que la mayoría de las MMPs son secretadas como zimógenos latentes, existen varias excepciones que contienen un motivo tipo furina entre el propéptido y el dominio catalítico y por consiguiente pueden ser activadas directamente dentro de la célula por miembros de la familia de convertasas de pro-proteínas tipo furina. [9-11, 13]

La activación extracelular de la mayoría de las MMPs es regulada por cascadas proteolíticas y pueden ser iniciadas por otras MMPs ya activadas, o por diferentes proteasas de serina que pueden romper uniones peptídicas dentro de los pro-dominios de las MMPs. Frecuentemente, la activación de las MMPs se lleva a cabo en el espacio pericelular inmediato, en sitios de alta afinidad por los precursores enzimáticos respectivos, como se ha visto para la activación de pro-MMP-2 por las enzimas metaloproteasas de matriz transmembranales tipo I. La activación de pro-MMP-2 por la MT1-MMP ha sido ampliamente documentada e involucra la formación de complejos de tres elementos consistiendo de MT1-MMP, TIMP-2, y pro-MMP-2 en una serie de eventos altamente organizados en la superficie celular. [10, 13]

Por otro lado, se ha propuesto que aunque la activación *in vitro* de todas las MMPs conocidas es llevada a cabo por procesamiento proteolítico del propéptido, otros mecanismos también pueden participar. [10, 13]

1.6.3 Inhibidores endógenos.

La actividad de las MMPs también puede ser controlada por diferentes inhibidores endógenos. Algunos de ellos son inhibidores de proteasas generales como α 2-macroglobulina, que principalmente bloquea la actividad de las MMPs en el plasma y en fluidos tisulares, mientras que otros inhibidores como los TIMPs (Inhibidores Tisulares de

Metaloproteasas de Matriz) son más específicos. Cuatro TIMPs han sido identificados en vertebrados, TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-4 son proteínas de secreción, mientras TIMP-3 está anclado a la MEC. Además de la acción inhibitoria de los TIMPs, la función de las MMPs también puede ser bloqueada por diferentes proteínas recientemente descritas. Algunas de ellas contienen secuencias con una cierta similitud al dominio N-terminal de los TIMPs. Tomando en conjunto, todas estas observaciones, se refleja la diversidad de inhibidores endógenos de las MMPs y la complejidad que puede ser derivada de sus actividades en condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo la fibrosis. [9-10, 13]

1.7 MMPs y Fibrosis Pulmonar.

Durante mucho tiempo se ha aceptado que las MMPs juegan un papel importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, pero los mecanismos exactos no están bien definidos. Existen diferentes procesos interrelacionados como: la remodelación de la MEC, la alteración de la membrana basal, apoptosis de las células epiteliales, migración celular y angiogénesis; en los que las MMPs juegan un papel central, ya sea rompiendo directamente componentes de la MEC o generando mediadores bioactivos. Sin embargo, son tantos los sustratos de las MMPs que significativamente han ampliado y complicado nuestro entendimiento sobre los mecanismos reales que subyacen en su influencia como ejecutoras proteolíticas y reguladoras en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. [13]

1.7.1 MMP-7 en FPI.

El análisis de la expresión génica por microarreglos en la FPI, ha mostrado que algunas MMPs se encuentran entre las moléculas más expresadas. Entre ellas la MMP-7 que es codificada por uno de los genes más distintivos entre pulmones fibróticos y normales. La MMP-7 presenta una alta afinidad por la heparina y es capaz de degradar y procesar diferentes sustratos de la MEC, así como sustratos bioactivos. La proteína es expresada principalmente por el epitelio anormal en pulmones con FPI y la forma activa de la enzima se observa en extractos de pulmones fibróticos. Recientemente, se ha visto que la MMP-7 colocaliza con la osteopontina en células epiteliales alveolares de pulmones con FPI. Algunos modelos han identificado una interacción estadísticamente significativa entre la osteopontina y la MMP-7, sugiriendo que las dos moléculas

interactúan para afectar el fenotipo de la FPI. Este hallazgo es interesante, debido a que el gen que codifica para la osteopontina es uno de los genes altamente expresados en pulmones de pacientes con FPI, y ésta citocina multifuncional regula diferentes funciones biológicas, incluyendo la adhesión celular, quimiotaxis, y señalización, así como procesos de reparación tisular. Además, parece ser que existe un mecanismo de retroalimentación positiva entre la osteopontina y la MMP-7. [13, 19]

Ratones *knockout* de la MMP-7 son normales en apariencia y es notable que desarrollan una fibrosis pulmonar atenuada en respuesta a la bleomicina. Diversos estudios han sugerido que la MMP-7 desempeña un papel fisiológico en la re-epitelización, apoptosis, inflamación, e inmunidad innata, entre otros. [20]

1.7.2 MMP-1 en FPI.

La expresión de la MMP-1 es baja en la mayoría de las células normales bajo condiciones fisiológicas y como otras MMPs, la MMP-1 no se detecta *in vivo* en un pulmón normal. Estudios del comportamiento transcripcional de genes derivados de células pulmonares durante FPI y de la expresión morfológica local de la proteína han mostrado invariablemente una alta expresión de la MMP-1. Este hallazgo en la FPI en cierta forma es contradictorio ya que la principal característica de una afección fibrótica es el depósito exagerado de colágenas fibrilares, que son el principal sustrato de esta enzima. Sin embargo, esta contradicción puede ser resuelta considerando que la MMP-1 está localizada principalmente en células epiteliales alveolares reactivas y en células epiteliales bronquiolares delineando los espacios de panal de abeja, y está virtualmente ausente del compartimento intersticial donde la colágena se acumula. Es interesante señalar que el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y la osteopontina han mostrado efectos similares en fibroblastos, inhibiendo la transcripción de la MMP-1 y aumentando la expresión de la colágena tipo I, y de TIMP-1. El papel de la MMP-1 en el epitelio pulmonar en el presente se desconoce. Esta enzima parece desarrollar un papel fundamental en la morfogénesis epitelial, que depende del movimiento específico de las células epiteliales. Como la MMP-1 no tiene un ortólogo preciso en la rata o ratón adulto, el posible papel patológico de esta enzima no ha podido ser explorado en modelos experimentales. [13, 19]

1.7.3 MMP-2 y MMP-9 en FPI.

Las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) son el subgrupo de MMPs más estudiado en las EPI del humano y en modelos experimentales de fibrosis pulmonar. Ambas gelatinasas contienen repeticiones de fibronectina tipo II dentro del dominio catalítico permitiendo una gran afinidad de unión a gelatina y elastina. [13, 19]

La MMP-2 (gelatinasa A) degrada un amplio rango de sustratos de MEC y sustratos que no pertenecen a la matriz. Es efectiva principalmente contra colágena tipo IV y otros componentes de la membrana basal, aunque presenta una débil habilidad para degradar colágenas del estroma. Es relevante señalar que análisis por microarreglos reveló que se encuentra altamente expresada en tejidos con FPI y la MMP-2 se encuentra usualmente aumentada en fluido de lavado bronquioalveolar. Además, se ha reportado que la MMP-2 está sobre-expresada en modelos experimentales de fibrosis pulmonar. [13] Los principales activadores fisiológicos de la pro-MMP-2 son miembros de la familia de metaloproteasas de matriz tipo membrana. La MT1-MMP se une con TIMP-2 y con pro-MMP-2 formando un complejo trimolecular. En FPI, se encontró que la MMP-2 se localiza en células epiteliales bronquiolares basales, en células epiteliales alveolares y en focos de fibroblastos. Interesantemente, algunos activadores de pro-MMP-2 (MT1-, MT2-, MT3-, y MT5-MMP) se observaron en las mismas localizaciones que MMP-2. Por consiguiente, la forma activa de la MMP-2 usualmente se encuentra en fluidos de lavados bronquioalveolares de pacientes con FPI y podría ser atribuida a la acción de estas enzimas. [13]

La MMP-2 (y la MMP-9) pueden provocar el descontrol de las membranas basales, que parece ser un evento importante en la patogénesis de la FPI ya que aumenta la invasión de fibroblastos dentro de los espacios alveolares. Además, el descontrol de la membrana basal puede contribuir en la falla de una reparación ordenada del daño a células epiteliales alveolares tipo I, afectando la re-epitelización normal, y además, puede tener un papel adicional deletéreo induciendo la apoptosis epitelial. De hecho, la integridad de la membrana basal es requerida para detener la muerte celular programada de células epiteliales. [13]

La MMP-9 también llamada gelatinasa B, contiene adicionalmente un dominio tipo colágena tipo V que está altamente glicosilado, y se ha sugerido que tiene un efecto sobre la especificidad al sustrato. Se ha mostrado que la expresión génica de la MMP-9 y de la proteína están elevadas en pulmones y en fluidos de lavado bronquioalveolar de pacientes con FPI. La enzima ha sido localizada en células epiteliales, neutrófilos y macrófagos con cierta tinción en fibroblastos subepiteliales. Interesantemente se ha asociado un incremento en la forma activa en lavado bronquioalveolar a un fenotipo clínico acelerado. [40] Del mismo modo, se ha reportado en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, un aumento de la actividad de la gelatinasa B y un trastorno de la membrana basal del epitelio alveolar. [13] También se ha demostrado que ratones transgénicos que sobre-expresan la MMP-9 por macrófagos alveolares desarrollan una reacción fibrótica pulmonar menos intensa después de ser instilados con bleomicina. [21] A pesar del papel fundamental de la MMP-9 en la fibrosis pulmonar, los ratones que carecen de MMP-9 desarrollan una fibrosis similar a la de los ratones *wild-type* después de la instilación con bleomicina. Sin embargo, los pulmones de ratones *knockout* de la gelatinasa B han mostrado una mínima bronquiolización alveolar, sugiriendo que la gelatinasa B facilita la migración de las células de Clara y de otras células bronquiolares dentro de regiones de daño alveolar. [13, 19]

1.7.4 TIMP-1 en FPI

TIMP-1 es una proteína de 29 kDa sintetizada por queratinocitos, fibroblastos, células de músculo liso y células endoteliales. Es capaz de inhibir la actividad de la mayoría de las MMPs, aunque se sabe que prefiere a la MMP-1, y no inhibe significativamente a MT1-MMP ni a MMP-19. [44] TIMP-1 es una molécula multifuncional que tiene el potencial para modificar un número de actividades celulares, además de su habilidad para modular el recambio de MEC. Se ha demostrado que TIMP-1 estimula la proliferación de fibroblastos en cultivo e induce la secreción de colagenasas en fibroblastos en cultivo. También, se ha mostrado que TIMP-1 modula la inflamación aguda *in vivo*. [36]

En pacientes con FPI, TIMP-1 usualmente se ha localizado en células intersticiales aisladas, principalmente en macrófagos, y en fibroblastos. Este inhibidor fue observado en áreas de densa cicatrización tisular, mientras que en pulmones control no se

encontró señal para TIMP-1. [37] También, mediante el análisis por microarreglos se ha observado que TIMP-1 se encuentra altamente expresado durante la FPI. [22] Teóricamente, la sobre-expresión de TIMPs favorece la acumulación local de MEC, debido a que son los inhibidores naturales de las MMPs, en realidad, modelos experimentales de fibrosis pulmonar muestran que en etapas tempranas, TIMP-1 se encuentra sobre-expresado y está asociado con la respuesta fibrótica. [43]

1.8 Modelo de Bleomicina para el Estudio de la Fibrosis Pulmonar.

Mucho de lo que actualmente conocemos sobre la patogénesis de la fibrosis pulmonar proviene de estudios realizados en animales. Los métodos convencionales para inducir fibrosis pulmonar experimental incluyen la instilación directa de un agente fibrogénico a través de la tráquea o la exposición a radiación torácica en un animal susceptible. La instilación intratraqueal de bleomicina es actualmente el modelo más popular para el estudio *in vivo* de la fibrosis pulmonar y el ratón (*Mus musculus*) es la especie más utilizada. [17]

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la mayoría, si no es que todos los modelos con animales experimentales para el estudio de la fibrosis, representan una fibrosis pulmonar caracterizada por inflamación y no desarrollan el patrón típico progresivo y destructivo que caracteriza a la FPI. [13]

El modelo de FP inducida por bleomicina ha sido caracterizado por tener dos etapas histopatológicas bien definidas: la inflamación caracterizada por infiltración de células inflamatorias que ocurre entre los días 3 y 7 post-instilación y la fibrosis caracterizada por la formación de cicatrices y el depósito de fibras de colágena que ocurre durante los días 21 y 28. [18]

La mayoría de los trabajos que han utilizado el modelo de bleomicina ha estudiado los cambios morfológicos hasta un periodo de 21-28 días. Sin embargo, recientemente Cabrera S. *et al* 2007, utilizaron un curso temporal post-instilación hasta 4 meses. Confirmando los estudios previos, observó que hay un incremento significativo de hidroxiprolina (utilizada como indicador del depósito de colágenas fibrilares) en el pulmón de ratones tratados con bleomicina después de 1 mes post-instilación. Interesantemente, observó que la FP es progresiva hasta los 2 meses, encontrando los

niveles más altos de hidroxiprolina durante este periodo. Después de un periodo de 3 y 4 meses, observó que ocurre una disminución significativa en los niveles de hidroxiprolina pulmonar, sugiriendo la posible reabsorción de la MEC. Estos datos fueron apoyados por el análisis histopatológico. ^[21] (Ver Figuras 2 y 3) Como se mencionó previamente, la familia de MMPs y TIMPs participan en el metabolismo de la MEC y por lo tanto están involucradas en la FPI. Existen diversos estudios que han explorado el papel de las MMPs durante la fibrosis en humanos y en modelos experimentales. En el modelo de bleomicina, sin embargo, no se ha explorado su expresión hasta 4 meses.

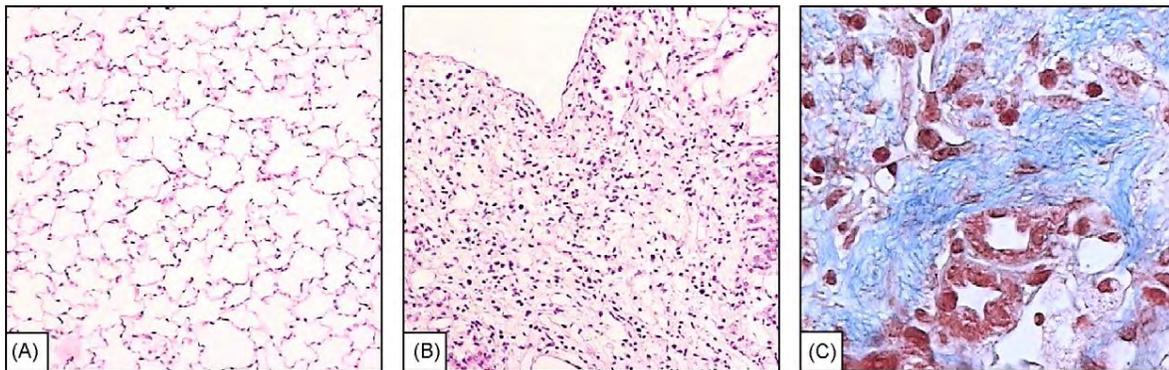


Figura 2. Microfotografía de cortes pulmonares de ratones *wildtype*. El panel A ilustra el corte pulmonar de un ratón control *wildtype* (H-E, 10X). El panel B muestra el corte pulmonar de un ratón *wildtype* de 8 semanas después de haber sido instilado con bleomicina (H-E, 10X). El panel C ilustra el corte pulmonar de un ratón de 8 semanas *wildtype*, después de haber sido instilado con bleomicina (Masson, 40X). Figura tomada de Cabrera S, et al. 2007. ^[21]

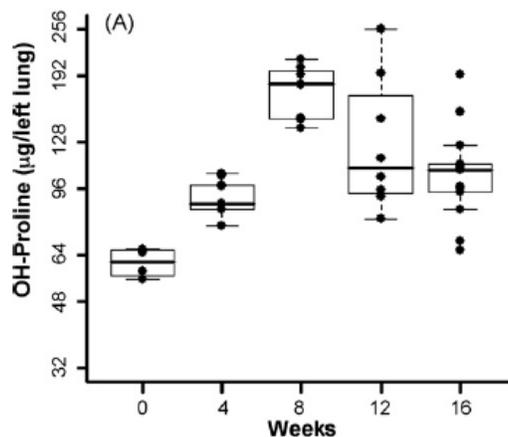


Figura 3. Ejemplo del efecto de la instilación de bleomicina en la hidroxiprolina del pulmón de ratones *wildtype*. Los niveles de hidroxiprolina aumentan al mes y es progresivo a dos meses, los niveles de hidroxiprolina disminuyen a los 3 y 4 meses post-bleomicina. Figura tomada de Cabrera S, et al. 2007. ^[21]

II Objetivo General

Analizar la expresión de MMP-7, MMP-8, MMP-14 (MT1-MMP), MMP-19 y TIMP-1 a nivel de RNAm en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratón (*Mus musculus*) durante el curso temporal (0-16 semanas).

2.1 Objetivos Particulares

- Purificar RNA total de pulmón de animales control y tratados con bleomicina.
- Sintetizar cDNA a partir del RNA total.
- Amplificar por PCR la MMP-7, MMP-8, MMP-14, MMP-19, TIMP-1 y 18S rRNA.
- Purificar los productos para diseñar curvas estándar.
- Cuantificar los niveles de RNAm de MMP-7, MMP-8, MMP-14, MMP-19 y TIMP-1 por PCR en tiempo real.

III. Metodología.

3.1 Población de Estudio.

Ratones (cepa C57BL/6) de 8 semanas fueron tratados con solución salina o bleomicina (0.13 U/10g) y sacrificados en diferentes periodos de tiempo (7 días, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 4 meses). El pulmón de estos ratones fue extraído. El pulmón izquierdo fue utilizado para la cuantificación de hidroxiprolina, mientras que el pulmón derecho fue utilizado para histología (Cabrera S, *et al* 2007) y para la extracción de RNA total.



3.2 Extracción de RNA.

Para llevar a cabo la extracción de RNA se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen), el procedimiento que se realizó fue el siguiente:

1. Homogenización.

Se homogenizaron de 50 a 100 mg de pulmón en un 1ml del reactivo Trizol, utilizando un homogenizador (Polytron).

2. Fase de Separación.

Se incubaron las muestras homogenizadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se adicionó 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml del reactivo Trizol. Se agitaron los tubos vigorosamente por 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. La centrifugación separó la mezcla en una fase inferior de color rojo (fenol-cloroformo), en una interfase (proteínas), y en una fase acuosa superior. El RNA queda exclusivamente en la fase acuosa.

3. Precipitación del RNA.

Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se precipitó el RNA de la fase acuosa mezclándolo con alcohol isopropílico. Se usaron 0.5 ml de alcohol isopropílico por cada 1 ml de reactivo Trizol utilizado en la homogenización inicial. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugaron a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C. El RNA precipitado frecuentemente es invisible antes de la centrifugación. Después de la centrifugación, el RNA formó un pellet tipo gel en la parte inferior del tubo.

4. Lavado del RNA.

Se retiró el sobrenadante. Se lavó una vez el pellet de RNA, con 1 ml de etanol al 75%, por cada 1 ml de reactivo Trizol utilizado en la homogenización inicial. Las muestras se centrifugaron a 7,500 x g durante 5 minutos de 4°C.

5. Recuperación del RNA.

Al final del procedimiento se dejó secar el pellet de RNA (al aire libre durante 10 minutos). Finalmente el RNA se disolvió en agua libre de RNasas.

3.3 Síntesis de cDNA por transcripción inversa (RT-PCR)

1. El RNA aislado fue cuantificado en un espectrofotómetro (nano-drop). En un tubo estéril, se adicionó la cantidad correspondiente a 1µg de RNA junto con agua tratada con DEPC, de tal manera que el volumen total fuera 8µl.
2. El RNA se trató con 1µl de DNasa (Invitrogen, 1U/1µl), junto con 1µl de Buffer de DNasa 10X. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Se agregó 1µl de EDTA 25mM para inhibir la actividad de la DNasa y se dejó incubando a 65°C por 10 minutos.
4. Se adicionó a la mezcla 1µl de hexámeros al azar (random hexamer primer), y se incubó a 70°C durante 2 minutos. Después el tubo se pasó rápidamente al hielo antes de comenzar con el siguiente paso.
5. Se añadió la siguiente mezcla de acuerdo a los volúmenes indicados en la tabla:

Reactivo	Volumen
Buffer de reacción 5X	4.0 µl
Mezcla de dNTP's (10mM cada uno)	1.0 µl
Inhibidor de RNasa	0.5 µl
Transcriptasa Reversa	1.0 µl
H ₂ O DEPC	1.5 µl

6. Se mezcló por inversión y se centrifugó en la microcentrifuga.
7. Se incubó a 42°C durante 1 hora, seguido por una incubación a 94°C por 5 minutos.

3.4 PCR

1. Se hizo una PCR para amplificar los productos de MMP-7, -8, -13, -14, 19, TIMP-1 y 18s rRNA, utilizando sondas *TaqMan* específicas para cada mensajero (Applied Biosystems) (ver tabla 2). La mezcla de reactivos que se ocupó fue la siguiente:

Reactivo	Volumen
MgCl ₂ 50mM	0.6 µl
PCR 10X Buffer	1.5 µl
dNTP's 2mM	1.0 µl
Sonda TaqMan 20X	0.5 µl
DNA polimerasa	0.15 µl
H ₂ O	7.25 µl
cDNA	4.0 µl

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

$$\begin{array}{c} \frac{94^{\circ}\text{C}}{2'} \quad \left| \quad \frac{94^{\circ}\text{C}}{15''} \quad \frac{60^{\circ}\text{C}}{1'} \quad \left| \quad \frac{4^{\circ}\text{C}}{\infty} \right. \\ 40\text{X} \end{array}$$

2. Se prepararon geles de agarosa al 1.5% para verificar que los tamaños de los productos de la PCR coincidieran con lo esperado (ver tabla 2).

Tabla 2. Sondas TaqMan utilizadas en la PCR.

Sonda TaqMan	MMP	Tamaño
Mm01168387_m1	MMP-8	89 pb
Mm00675904_g1	MMP-14 (MT1-MMP)	61 pb
Mm01159954_g1	MMP-19	71 pb
Mm01168420_m1	MMP-7	78 pb
Mm01341359_g1	TIMP-1	86 pb
	18 rRNA-FAM	187 pb

3.5 Purificación de los productos de la PCR de los geles de agarosa (gene-clean).

Se extrajo la banda de DNA del gel de agarosa con un bisturí estéril. Se trató de minimizar el tamaño del gel quitando el exceso de agarosa. Se utilizó un tubo de 1.5 ml para procesar 250 mg de agarosa. Se utilizó el Kit QIAEX (Chemicon); este *kit* esta basado en la interacción del DNA con una resina de carga positiva.

Se siguieron las siguientes instrucciones:

- 1) La agarosa se mezcló con la resina (30µl de QIAEX II) y con 300µl de QIAEX I y se incubó a 50°C durante 10 minutos para solubilizar la agarosa y unir el DNA a la resina.
- 2) Se centrifugó la muestra por 30 segundos y cuidadosamente se quitó el sobrenadante con una pipeta.
- 3) Se lavó el pellet con 500µl de Buffer QX1. Se centrifugó la muestra por 30 segundos y se retiró todo rastro de sobrenadante con una pipeta. Este paso de lavado quitó contaminantes de agarosa residuales.
- 4) Se lavó el pellet dos veces con 500µl del Buffer PE (que contiene etanol). Se resuspendió el pellet mezclándolo. Se centrifugó la muestra por 30 segundos y cuidadosamente se retiró todo rastro de sobrenadante con una pipeta. Estos pasos de lavado quitaron contaminantes de sales residuales.
- 5) Se dejó secar el pellet al aire libre.
- 6) Para eluir el DNA, se adicionaron 20µl de agua y se mezcló con el pellet y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

- 7) Se centrifugó la muestra durante 30 segundos. Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. El sobrenadante contiene el DNA purificado.
- 8) Se repitieron los pasos del 6 al 7 y se combinaron los eluidos. Este segundo paso de elución fue para incrementar el rendimiento un 10-15%.

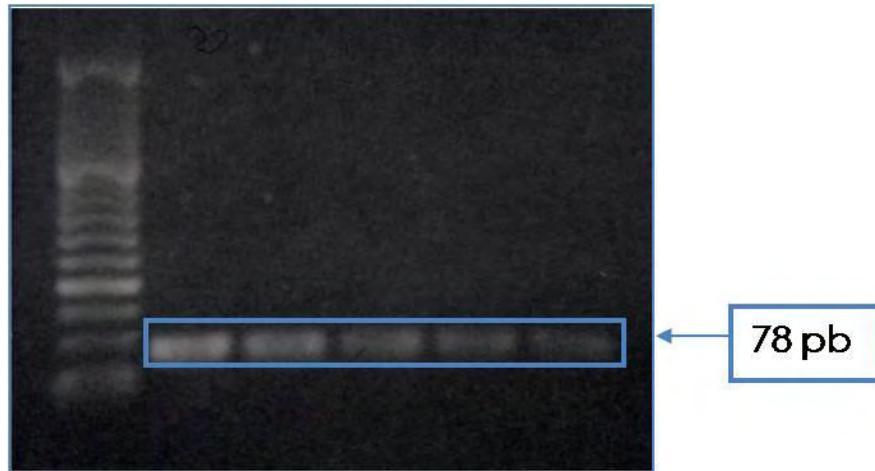


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En el primer carril (de izquierda a derecha) se muestra el marcador de peso molecular (50 pb), y en los siguientes carriles se muestra el producto obtenido de 78 pb (MMP-7). Las bandas correspondientes al producto de la PCR fueron cortadas y purificadas como se mencionó anteriormente. Se procedió de la misma forma para los productos de la MMP-8, -13, -14, -19, TIMP-1 y 18s rRNA.

3.6 Elaboración de Curvas Estándar para la cuantificación de la expresión génica por RT-PCR Cuantitativo (q-PCR).

Se cuantificaron los productos específicos de cada gen blanco que se obtuvo por gene-clean en un espectrofotómetro (*nanodrop*) (ver tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de los productos obtenidos por gene-clean y número de copias de cada producto.

Gen	Tamaño del producto	¶ del producto	No. de copias/µl
TIMP-1	86 pb	12.9 ng/µl	1.3686 X 10 ¹¹
MMP-8	89 pb	14.1 ng/µl	1.44552 X 10 ¹¹
MT1-MMP (MMP-14)	61 pb	17.1 ng/µl	2.55778 X 10 ¹¹
MMP-19	71 pb	16.0 ng/µl	2.05616 X 10 ¹¹
MMP-7	78 pb	17.4 ng/µl	2.03542 X 10 ¹¹
18s rRNA	187 pb	47.6 ng/µl	2.32254 X 10 ¹¹

Se calculó el número de copias del producto/µl utilizando el procedimiento que a continuación se describe:

teniendo en cuenta que el peso molecular de un par de bases es igual a 660 Daltones, y que cada mol contiene 6.022×10^{23} moléculas, se utilizó la siguiente fórmula para calcular la estimación del número copias presentes:

$$\text{copias/ng} = (n \times \text{MW}) / \text{NA} \times 1 \times 10^{-9}$$

dónde:

n = tamaño del producto en pares de bases.

MW = peso molecular, 660 Da por cada par de bases.

NA = número de Avogadro 6.022×10^{23}

Se ajustó el número de copias de cada producto a 1×10^{11} copias y se hicieron diluciones seriales 1:10 para obtener una curva estándar ($1 \times 10^{10} - 1 \times 10^1$).

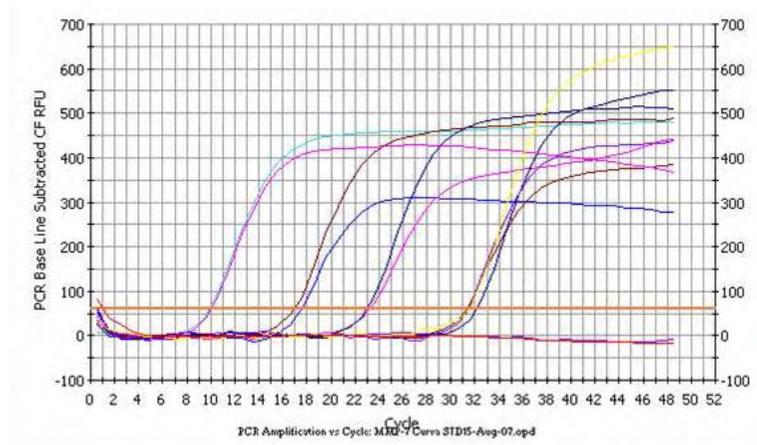


Figura 6. Ejemplo de la curva estándar de MMP-7 para ayudarnos a determinar el ciclo en el que la fluorescencia alcanzó el ciclo umbral (C_T).

Las curvas de amplificación fueron graficadas por el programa para ayudarnos a determinar el ciclo al que la fluorescencia alcanzó un nivel de umbral (C_T). Se determinó el C_T de cada punto de la curva estándar. Este valor de C_T es inversamente proporcional a la cantidad de gen blanco en la muestra original. Utilizamos la cuantificación relativa y para esto utilizamos el gen constitutivo 18s rRNA (el cual se espera que no cambie durante las condiciones experimentales por lo que sirve como un estándar endógeno conveniente).

3.7 Fundamentos teóricos de la cuantificación por PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan.

Las sondas TaqMan MGB (*minor groove binder*) contienen:

- Un fluorocromo o *reporter* (6-FAM) unido al extremo 5' de la sonda.
- Un MGB (enlazante al surco menor). Los MGB's incrementan la temperatura de fusión (T_m) sin aumentar la longitud de la sonda; también permiten el diseño de sondas pequeñas.
- Un *quencher* (NFQ) en el extremo 3' de la sonda.

La reacción PCR explota la actividad 5' nucleasa del sistema de la DNA polimerasa para partir a la sonda TaqMan durante la PCR. La sonda TaqMan contiene un fluorocromo unido en el extremo 5' ó *reporter* y otro unido en el extremo 3' ó *quencher*. Durante la reacción, el rompimiento de la sonda separa el *reporter* y al *quencher*. Esta

separación provoca un aumento en la fluorescencia del *reporter*. La acumulación de los productos de la PCR son detectados directamente por el monitoreo del incremento de la fluorescencia del *reporter*.

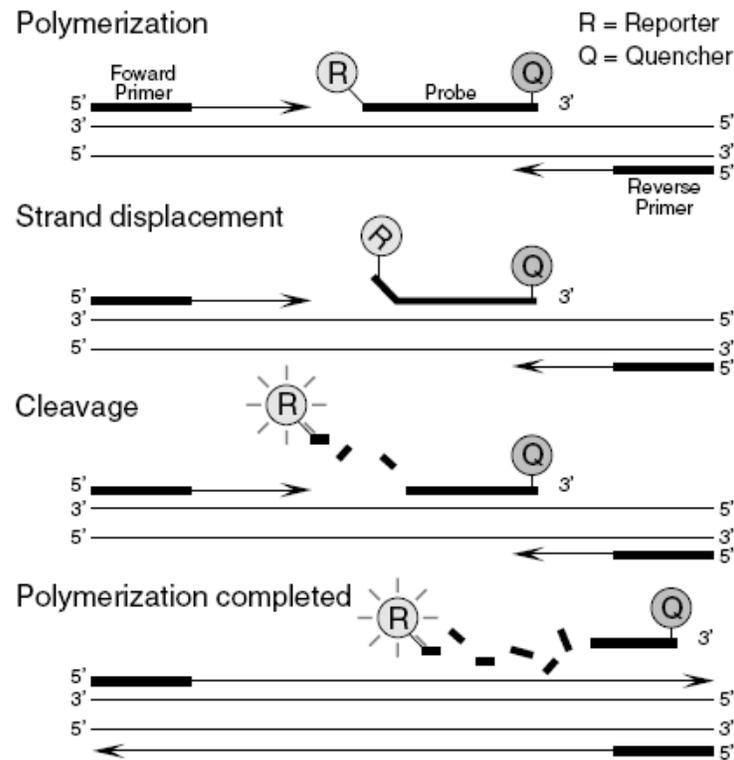


Figura 7. Actividad nucleasa 5'-3' del sistema de la DNA polimerasa. (Figura tomada de TaqMan Gene Expression Assays Protocol).

Cuando la sonda está intacta, la proximidad del *reporter* y el *quencher* provoca la supresión de la fluorescencia del *reporter*, principalmente por la energía de transferencia tipo *Förster*. Durante la PCR, si la secuencia de interés está presente, la sonda específicamente hibrida entre los sitios de los primers sentido y antisentido.

La actividad nucleolítica 5'-3' del sistema de la DNA polimerasa rompe la sonda entre el *reporter* y el *quencher* sólo si la sonda hibrida con la secuencia de interés. Los fragmentos de la sonda son desplazados de la secuencia de interés, y la polimerización de la cadena continúa. El extremo 3' de la sonda está bloqueado para prevenir la extensión de la sonda durante la PCR. Este proceso ocurre cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto.

El incremento en la señal de fluorescencia es detectado sólo si la secuencia de interés es complementaria con la de la sonda y sí es amplificada durante la PCR. Debido a estos requerimientos, cualquier amplificación no específica no es detectada (ver Figura 7).

3.8 PCR Cuantitativo (q-PCR).

1. Se hizo una PCR en tiempo real para medir la expresión génica de los productos: MMP-7, -8, -14, 19, TIMP-1 y 18s rRNA, utilizando sondas TaqMan específicas para cada secuencia de interés (ver tabla 1). La mezcla de reactivos que se ocuparon fue la siguiente:

Reactivo	Volumen
MgCl ₂ 50mM	0.6 µl
PCR 10X Buffer	1.5 µl
dNTP's 2mM	1.0 µl
Sonda TaqMan 20X	0.5 µl
DNA polimerasa	0.15 µl
H ₂ O	7.25 µl
cDNA	4.0 µl

Las condiciones de la PCR en tiempo real fueron las siguientes:

$$\frac{94^{\circ}\text{C}}{2'} \left| \frac{94^{\circ}\text{C}}{15''} \frac{60^{\circ}\text{C}}{1'} \right| \frac{4^{\circ}\text{C}}{\infty}$$

50X

3.9 Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como el cociente del gen blanco/18S rRNA. Los datos mostrados en las gráficas representan el promedio \pm desviación estándar. Para analizar diferencias entre los grupos se utilizó la prueba de Tukey y se consideró como significativo una $p < 0.05$.

IV Resultados.

4.1 Análisis de los productos de RT-PCR.

Se verificó si el tamaño de los productos específicos para cada gen correspondía a lo esperado mediante electroforesis en un gel de agarosa. Como se muestra en la *Figura 8*, el tamaño de los productos coincide con el tamaño esperado: MMP-7 (78 pb), MMP-8 (89 pb), MMP-14 (61 pb), MMP-19 (71 pb), TIMP-1 (86 pb) y 18s rRNA (187 pb). Además corroboramos que no hubiera amplificación de productos inespecíficos ya que obtuvimos una sola banda en cada gen analizado como se muestra en la *Figura 8*.

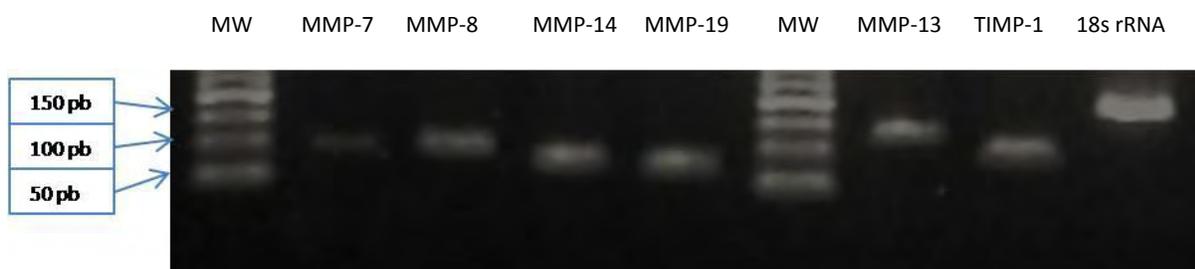


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, donde se muestran cada MMP y TIMP-1 para corroborar que la purificación salió bien. En el primer carril (de izquierda a derecha) se muestra el marcador de peso molecular (50 pb), en el segundo carril la MMP-7, en el tercer carril la MMP-8, en el cuarto carril la MMP-14, en el quinto carril la MMP-19, en el sexto otra vez el marcador, en el séptimo carril la MMP-13, en el octavo carril el TIMP-1 y en el último carril el 18s rRNA.

4.2 PCR Cuantitativo

4.2.1 MMP-7

Como ya se ha observado, MMP-7 es uno de los genes más distintivos al ser analizado por microarreglos de nucleótidos de DNA durante la FPI. También se ha visto que el ratón *knockout* de MMP-7 presenta una protección contra la fibrosis en comparación con el ratón silvestre al ser tratados con bleomicina. Al analizar la expresión de MMP-7 por qPCR encontramos que incrementó significativamente durante los periodos de 1 mes ($p < 0.01$) y 2 meses ($p < 0.05$) post-tratamiento; coincidiendo con la etapa de fibrosis. Sin embargo su expresión disminuyó en los periodos 3 meses (1 mes vs 3 meses; $p < 0.05$) y 4 meses post-instilación. Los grupos control (0, 3m y 4m) no mostraron cambios significativos. (ver *Figura 9*)

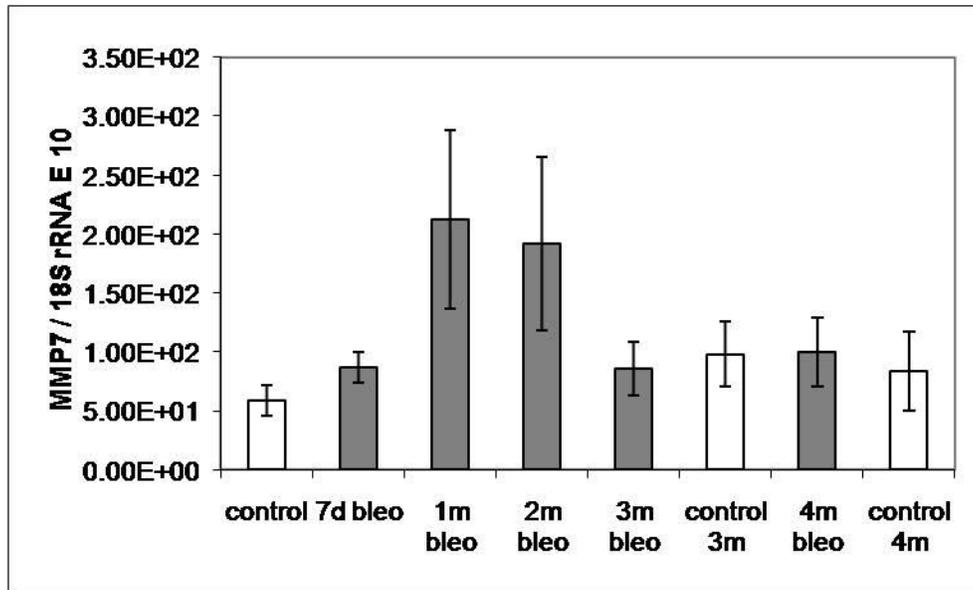


Figura 9. Cuantificación de la expresión de MMP-7 por PCR cuantitativo. Se realizó un qPCR con la ayuda de sondas *TaqMan* específicas para MMP-7, MMP-8, MMP-14, MMP-19 y TIMP-1 para determinar los niveles de RNAm de estas enzimas durante el curso temporal. Los datos están representados en gráficas donde en el eje de las "y" se muestra la relación del gen blanco contra el 18s rRNA (usado como control endógeno), y en el eje de las "x", en color blanco se representan los grupos de ratones control y en gris los grupos de ratones tratados con bleomicina.

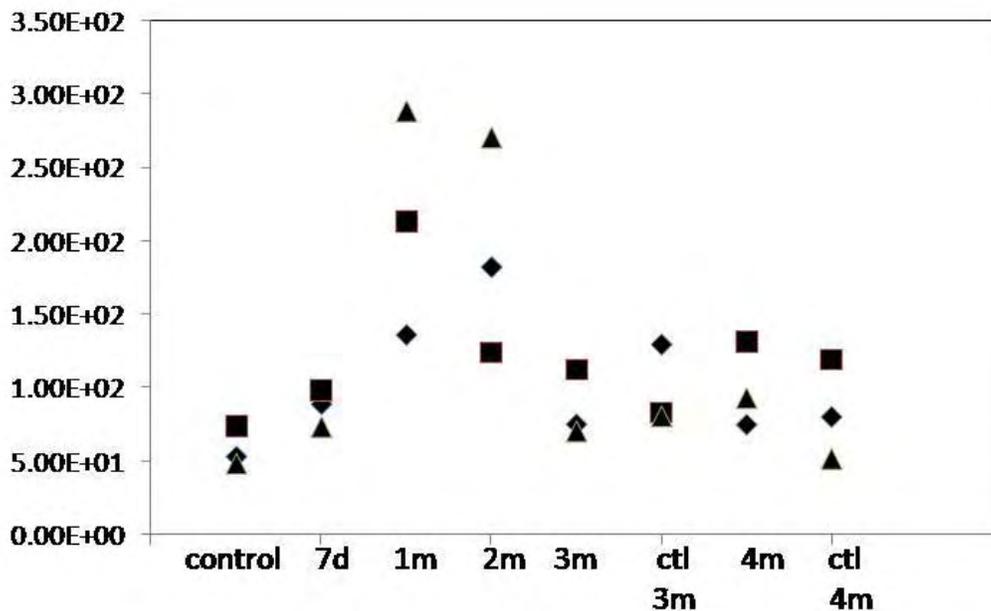


Figura 9.1. Cuantificación de la expresión de MMP-7 por PCR cuantitativo. Se muestra el número de individuos por separado en cada grupo (n=3).

GRUPOS	control	7 días	1 m	2 m	3 m	3 m control	4 m	4 m control
control	--	-1.14591	-6.21225	-5.39008	-1.11365	-1.58755	-1.66799	-1.01822
7 días	n.s.	--	-5.06633	-4.24417	0.03227	-0.44163	-0.52208	0.12769
1 m	p<0.01	n.s.	--	0.82217	5.09860	4.62470	4.54425	5.19403
2 m	p<0.05	n.s.	n.s.	--	4.27644	3.80254	3.72209	4.37186
3 m	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	--	-0.47390	-0.55435	0.09543
3 m control	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	--	-0.08045	0.56933
4 m	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	--	0.64977
4 m control	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	--

Tabla 4. Prueba estadística de Tukey. Al compararse los grupos se encontró una p<0.01 en control vs 1 mes y una p<0.05 en control vs 2 meses.

4.2.2 MMP-8

La expresión de MMP-8 aumentó significativamente durante los periodos 7 días (p<0.01), y 1 mes (p<0.05); también tuvo un aumento no significativo a 2 meses post-instilación con respecto al control 0. Disminuyó su expresión a 3 y 4 meses post-bleomicina. No hubo diferencias entre los grupos control (0, 3 y 4 meses). (Ver Figura 10)

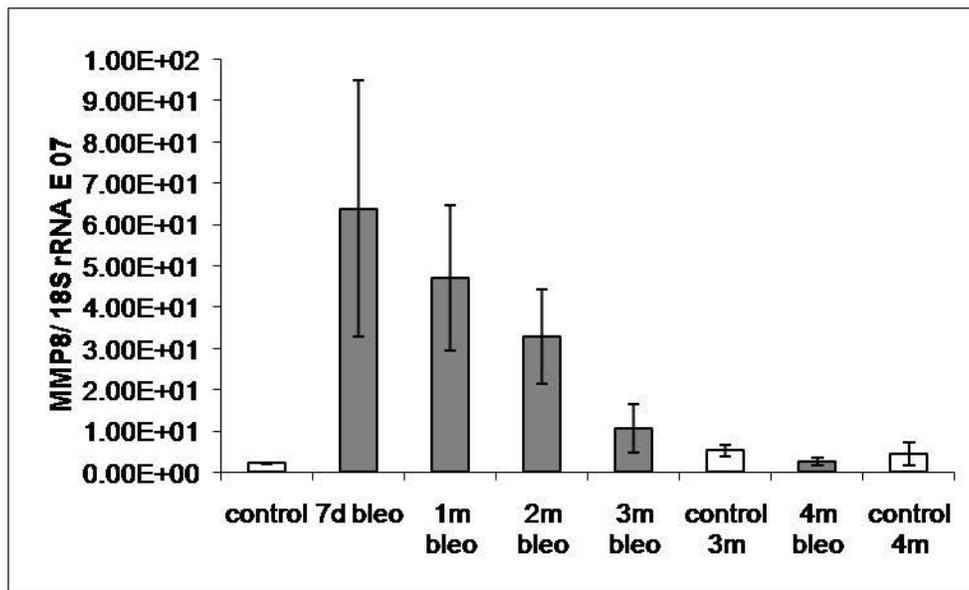


Figura 10. Cuantificación de la expresión de MMP-8 por PCR cuantitativo. Se observa un incremento significativo en la expresión a los 7d, 1m y 2m con respecto al control y una disminución a los 3 y 4m post-tratamiento.

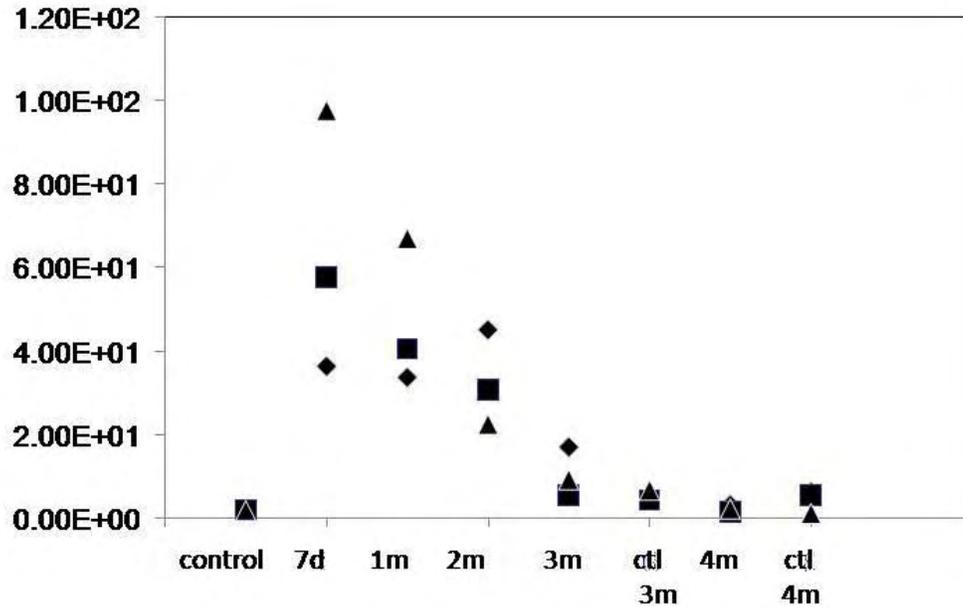


Figura 10.1. Cuantificación de la expresión de MMP-8 por PCR cuantitativo. Se muestra el número de individuos por separado en cada grupo (n=3).

Grupos	control	7 días	1 m	2 m	3 m	3 m control	4 m	4 m control
control	--	-7.95315	-5.79070	-3.95726	-1.10487	-0.39910	-0.04130	-0.29796
7 días	p<0.01	--	2.16246	3.99590	6.84829	7.55406	7.91185	7.65519
1 m	p<0.05	n.s.	--	1.83344	4.68583	5.39160	5.74940	5.49273
2 m	n.s.	n.s.	n.s.	--	2.85239	3.55816	3.91596	3.65929
3 m	n.s.	p<0.01	n.s.	n.s.	--	0.70577	1.06357	0.80690
3 m control	n.s.	p<0.01	p<0.05	n.s.	n.s.	--	0.35780	0.10113
4 m	n.s.	p<0.01	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	--	-0.25666
4 m control	n.s.	p<0.01	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	--

Tabla 5. Prueba estadística de Tukey. Al compararse los grupos se encontró una p<0.01 en 7d vs control, y una p<0.05 en control vs 1 mes.

4.2.3 MMP-14 (MT1-MMP)

La expresión de MMP-14 incrementó a partir de los 7 días permaneciendo elevada hasta los 2 meses post-instilación (p<0.01). Sin embargo, su expresión disminuyó a 3 meses post-bleomicina. No se encontraron diferencias entre el control 0 (8 semanas) y los controles 3 y 4 meses. (ver Figura 11).

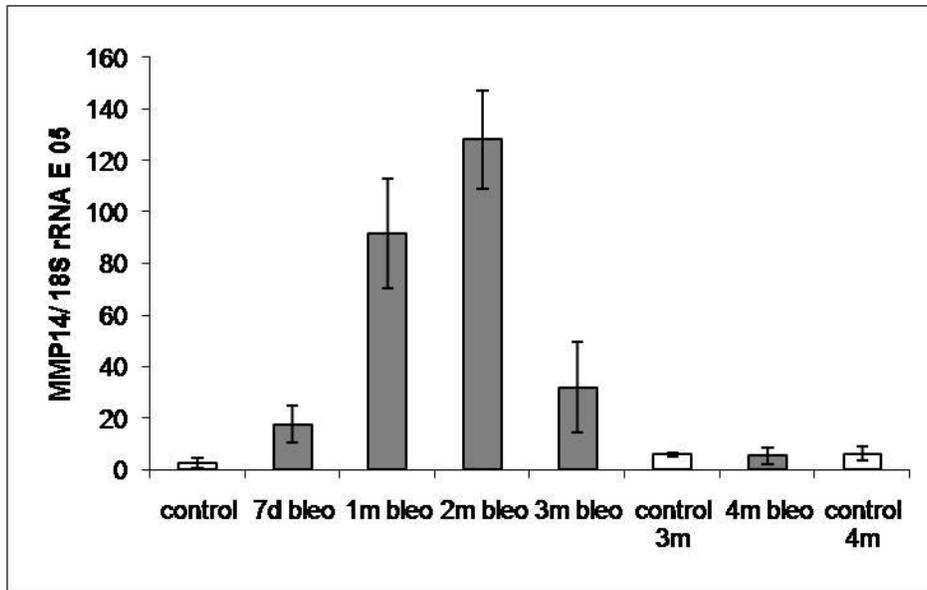


Figura 11. Cuantificación de la expresión de MMP-14 por PCR cuantitativo. Se observa un incremento en la expresión significativo a los 7d, 1m y 2m con respecto al control y una disminución a los 3 y 4 meses post-bleomicina.

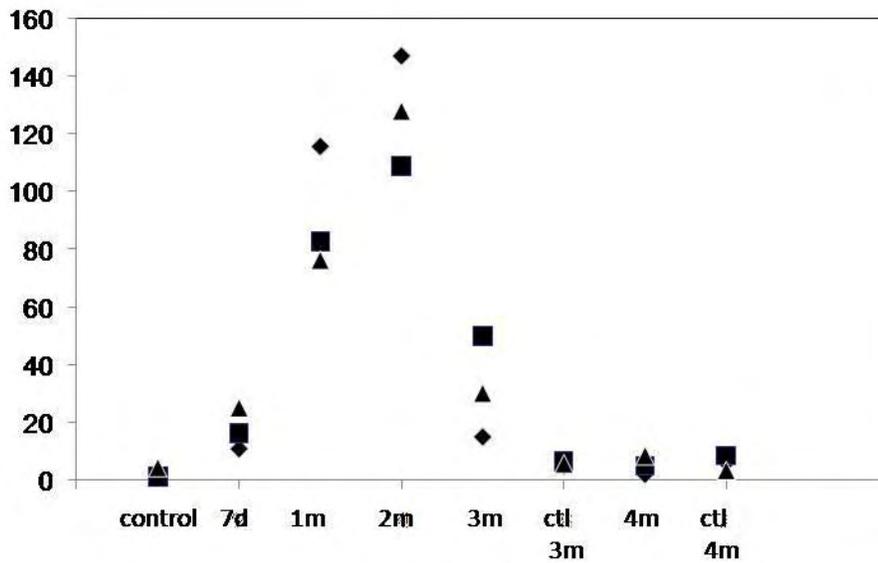


Figura 11.1. Cuantificación de la expresión de MMP-14 por PCR cuantitativo. Se muestra el número de individuos por separado en cada grupo (n=3).

Grupos	control	7d	1m	2m	3m	3m ctl	4m	4m ctl
control	--	-	-12.63047	-17.78859	-4.15702	-0.47762	-0.40503	-0.51592
7d	n.s.	--	-10.50080	-15.65893	-2.02735	1.65205	1.72464	1.61375
1m	p<0.01	p<0.01	--	-5.15812	8.47345	12.15285	12.22544	12.11455
2m	p<0.01	p<0.01	p<0.05	--	13.63158	17.31097	17.38357	17.27267
3m	n.s.	n.s.	p<0.01	p<0.01	--	3.67940	3.75199	3.64109
3m ctl	n.s.	n.s.	p<0.01	p<0.01	n.s.	--	0.07259	-0.03830
4m	n.s.	n.s.	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	--	-0.11090
4m ctl	n.s.	n.s.	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	--

Tabla 6. Prueba estadística de Tukey. Al compararse los grupos se encontró una p<0.01 en control vs 1 mes, y una p<0.01 en control vs 2 meses.

4.2.4 MMP-19

Al analizar la expresión de MMP-19, no se alcanzó apreciar una tendencia bien definida, al parecer su expresión se mantiene constante durante el curso temporal. No se encontraron diferencias significativas en ningún punto. (ver Figura 12)

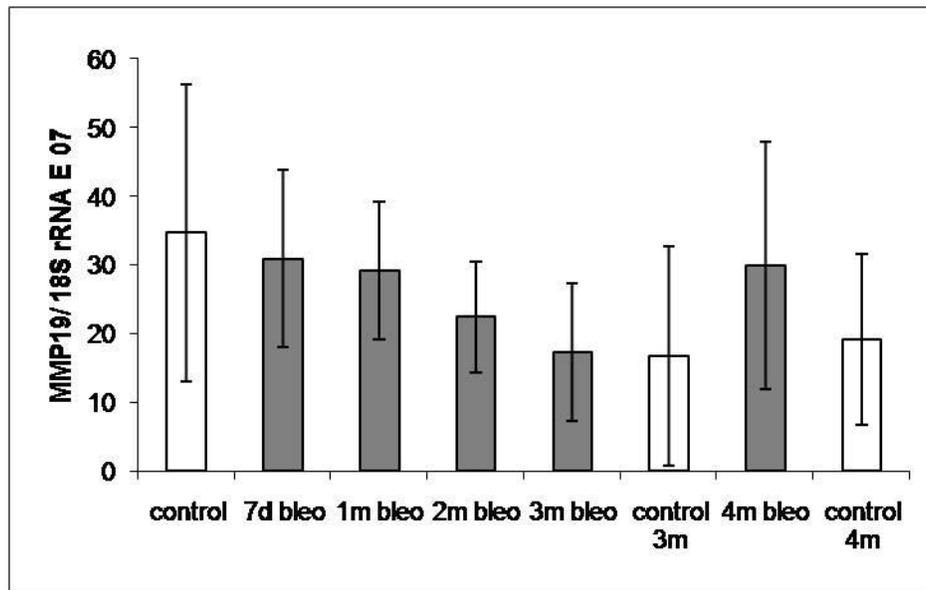


Figura 12. Cuantificación de la expresión de MMP-19 por PCR cuantitativo. No se distingue una clara tendencia, se mantiene constante su expresión.

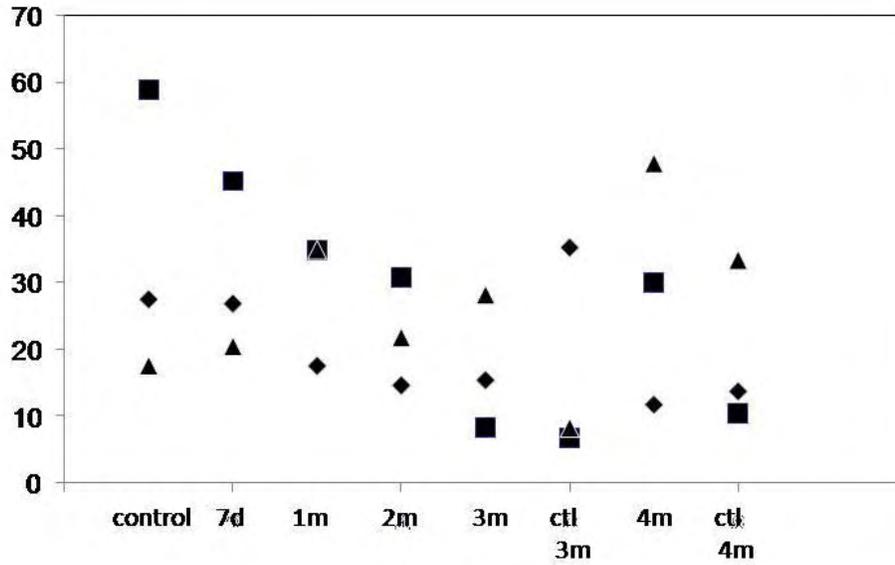


Figura 12.1. Cuantificación de la expresión de MMP-19 por PCR cuantitativo. Se muestra el número de individuos por separado en cada grupo (n=3).

Grupos	control	7 días	1 m	2 m	3 m	3 m control	4 m	4 m control
control	--	0.46182	0.67668	1.48721	2.10539	2.17361	0.58537	1.88016
7 días	n.s.	--	0.21486	1.02539	1.64358	1.71180	0.12355	1.41834
1 m	n.s.	n.s.	--	0.81053	1.42872	1.49694	0.09131	1.20348
2 m	n.s.	n.s.	n.s.	--	0.61819	0.68641	0.90184	0.39295
3 m	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	--	0.06822	1.52003	0.22523
3 m control	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	--	1.58825	0.29346
4 m	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	--	1.29479
4 m control	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	--

Tabla 7. Prueba estadística de Tukey. Al compararse los grupos no se encontró significancia.

4.2.5 TIMP-1

Como ya se ha observado en otros trabajos, se ha identificado que la expresión de TIMP-1 se encuentra elevada en la fibrosis pulmonar. De la misma manera obtuvimos datos que apoyan que la expresión de esta enzima se encuentra aumentada durante la etapa de fibrosis: durante los periodos 7 días y 1 mes la expresión se elevó significativamente ($p < 0.01$), permaneciendo elevada hasta 3 meses post-tratamiento con respecto al control 0. Y disminuyeron a 4 meses post-instilación. Los grupos control (0, 3 y 4 meses) no mostraron diferencias entre ellos. (ver Figura 13)

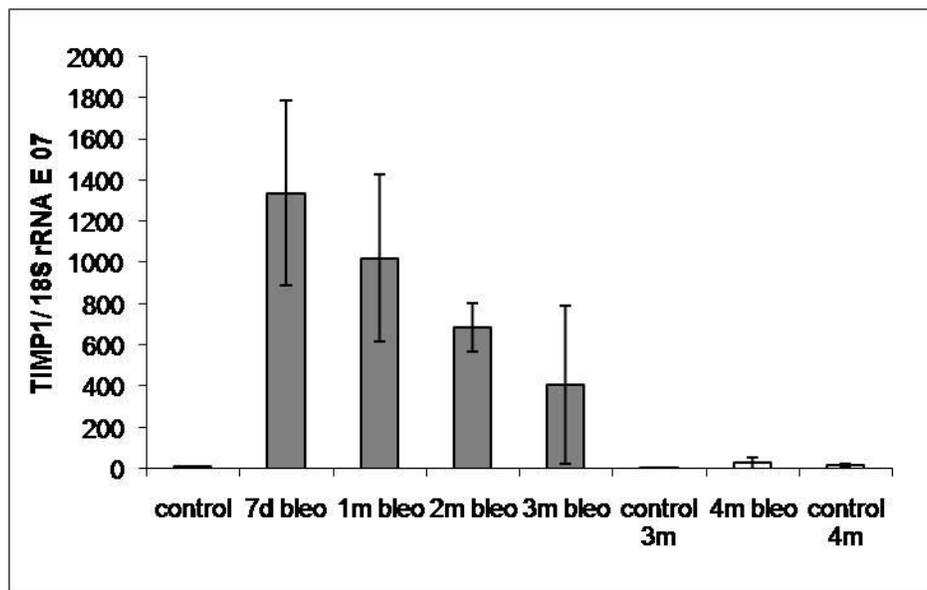


Figura 13. Cuantificación de la expresión de TIMP-1 por PCR cuantitativo. Se observa un aumento significativo de la expresión a los 7d, 1m y 2m con respecto al control y una disminución de la expresión a 3 y 4 meses.

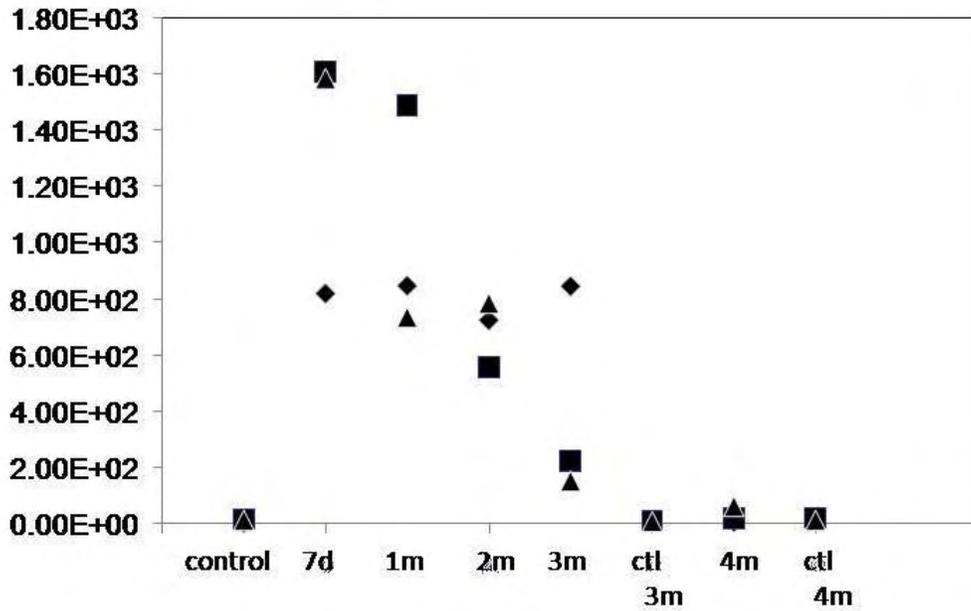


Figura 13.1. Cuantificación de la expresión de TIMP-1 por PCR cuantitativo. Se muestra el número de individuos por separado en cada grupo (n=3).

Grupos	control	7 días	1 m	2 m	3 m	3 m control	4 m	4 m control
control	--	-8.95363	-6.82878	-4.57678	-2.67050	0.02145	-0.13017	-0.04257
7 días	p<0.01	--	2.12484	4.37685	6.28313	8.97508	8.82346	8.91106
1 mes	p<0.01	n.s.	--	2.25201	4.15829	6.85024	6.69862	6.78622
2 meses	n.s.	n.s.	n.s.	--	1.90628	4.59823	4.44661	4.53421
3 meses	n.s.	p<0.01	n.s.	n.s.	--	2.69195	2.54033	2.62793
3 m control	n.s.	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	--	-0.15162	-0.06402
4 meses	n.s.	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	--	0.08760
4 m control	n.s.	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	--

Tabla 8. Prueba estadística de Tukey. Al compararse los grupos se encontró una p<0.01 en 7d vs control y una p<0.01 en 1 mes vs control.

V. Discusión

La FPI es una enfermedad pulmonar devastadora, letal de etiología desconocida y hasta ahora intratable. Se caracteriza por la activación y daño al epitelio, la formación de focos de fibroblastos y una exagerada acumulación de MEC con la consiguiente destrucción del parénquima pulmonar. Aunque la fibrosis progresiva e irreversible en el pulmón sugiera una disminución en la maquinaria degradativa pulmonar, un gran cúmulo de evidencias, principalmente obtenida por estudios de expresión global, demuestran una sobre-expresión significativa de enzimas degradadoras (principalmente MMPs) en la FPI. [19] El modelo de FP inducida por bleomicina en ratones, aunque no representa el patrón progresivo y letal de la FPI es el modelo actualmente más usado para el entendimiento de esta patología.

MPP-7 (también conocida como matrilisina), es una metaloproteasa que anteriormente no se había asociado con la fibrosis pulmonar. Sin embargo, estudios por microarreglos de oligonucleótidos han identificado a la MMP-7 como el gen más informativo de entre una amplia gama de genes incrementados en pulmones con FPI. [20, 24] Además, se ha visto que los ratones *knockout* de la MMP-7 presentan una protección a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, por lo que esta metaloproteasa juega un papel importante en el desarrollo de la fibrosis pulmonar. [20] También, se ha demostrado por inmunohistoquímica que ésta enzima es expresada principalmente por epitelio anormal en pulmones con FPI y por zimografía se ha mostrado que la proteína activa se encuentra en tejidos pulmonares con FPI. [13] En el presente estudio, se encontró por PCR en tiempo real que hay un incremento en su expresión a 1 mes y 2 meses post-bleomicina y una disminución a 3 meses post-bleomicina. Por lo que, en general, la matrilisina se mantiene altamente expresada en fibrosis pulmonar. No obstante, diferentes estudios han sugerido que ésta enzima juega un papel fisiológico durante la apoptosis, inflamación, e inmunidad innata, entre otros; por lo que, probablemente ésta enzima se encuentra estrechamente ligada a la fibrosis pulmonar. [13]

La **MMP-8** (también llamada colagenasa 2), es producida durante la maduración de los neutrófilos y principalmente se localiza en los gránulos secundarios que son secretados en respuesta a una gran variedad de estímulos. Sin embargo, ha sido reportado que en otros tipos celulares, como los macrófagos y otras células producen la MMP-8, por lo que ésta proteasa podría desempeñar otros papeles además de degradar colágenas intersticiales. ^[25] La reciente disponibilidad de los ratones mutantes deficientes en MMP-8 ha permitido investigar la contribución individual de esta enzima en el proceso de curación de heridas. Tal es el caso del trabajo de *Gutiérrez-Fernández A, et al (2007)*, en el que se demostró la relevancia funcional de ésta colagenasa en este proceso, utilizando ratones *MMP8^{-/-}*, los cuales exhibieron un retraso significativo en el cierre de la herida y en la re-epitelización. También se mostró que este retraso está asociado con alteraciones marcadas en la respuesta inflamatoria, características del proceso de curación. Además, observó que este defecto en la curación puede ser revertido con el trasplante de médula ósea de animales *wild-type* a ratones *MMP8^{-/-}*, poniendo en evidencia que la MMP-8 derivada de células inflamatorias, es necesaria para el proceso de reparación de heridas para proceder con normalidad. De hecho, la pérdida de la MMP-8 resulta en un retardo en la reparación de herida en piel, indicando que su actividad es necesaria para que este proceso se dé con normalidad, pero es prescindible para el cierre de la herida, ya que este proceso es completado en animales *MMP8^{-/-}*. ^[26] Hasta ahora existen pocos estudios realizados con esta proteasa en relación a la fibrosis pulmonar, uno de estos trabajos exploró la localización de MMP-8 en pulmones con FPI, y encontraron que usualmente se encuentra en algunos neutrófilos dentro de los vasos, y en dos pacientes con FPI la observaron en el intersticio. En este trabajo de tesis se demostró que la expresión de MMP-8 aumentó a 7 días post-bleomicina manteniendo una expresión elevada hasta 3 meses post-tratamiento, con respecto al control; y disminuyendo su expresión a los 3 y 4 meses post-tratamiento concordando con la posible resolución de la fibrosis. Todos estos datos mencionados anteriormente indican que ésta metaloproteasa está relacionada con el desarrollo de la fibrosis pulmonar.

De entre todas las MMPs, la **MMP-19** presenta características estructurales y de distribución tisular únicas. El cDNA de la MMP-19 humana, fue inicialmente clonado de

hígado y glándula mamaria. El dominio catalítico de ésta enzima es capaz de degradar componentes de la membrana basal (laminina, colágena tipo IV, nidogeno), del tejido conectivo (fibronectina, gelatina tipo I), y del cartílago; pero no degrada colágena tipo I en triple hélice. [27] Gracias a la reciente generación de los ratones deficientes en MMP-19 se ha tenido evidencia de la participación de ésta proteasa durante eventos de remodelación tisular como aquellos que ocurren durante la adipogénesis y la progresión tumoral. Aunque la falta de la MMP-19 no afecta la viabilidad, fertilidad y desarrollo de los ratones, si permite una obesidad inducida por dieta, y una disminución en la susceptibilidad de tumores en la piel inducidos por carcinógenos químicos. [28] La expresión del RNAm de la MMP-19 y la producción de la pro-MMP-19 por fibroblastos humanos se ha detectado *in vivo* en heridas de la piel y en cultivos de fibroblastos. [29] Hasta ahora, son escasos los estudios en los que se relacione a la MMP-19 con la fibrosis pulmonar; al estudiar su expresión por PCR en tiempo real, no encontramos una clara evidencia de que su expresión se encontrara elevada o disminuida en estos periodos, por el contrario, observamos que su expresión se mantuvo constante durante el curso temporal. Por consiguiente, es necesario profundizar en el estudio de la participación de la MMP-19 durante la fibrosis pulmonar para el entendimiento de esta patología.

La **MT1-MMP** (metaloproteasa de matriz tipo membrana 1) degrada diferentes componentes de la MEC incluyendo a las colágenas tipo I, II y III, fibronectina, lamininas tipo 1 y 5, vitronectina, fibrina y agregano. La actividad colagenolítica de la MMP-14 es crucial durante el desarrollo, ya que los ratones *knockout* de la MT1-MMP sufren severas complicaciones en la remodelación del esqueleto y tejidos conectivos, dando como resultado la muerte temprana de los ratones. Hasta ahora, ésta enzima es la única MMP que se ha encontrado que es esencial para la supervivencia. [30-34] También se ha observado que ésta proteasa tiene la habilidad para iniciar cascadas de activación de zimógenos, incluyendo la activación de pro-MMP-2, y pro-MMP-13, e indirectamente de la pro-MMP-9. Además los fibroblastos de piel del ratón deficiente en MMP-14 pierden completamente la habilidad para degradar colágenas fibrilares *in vitro* mientras que los ratones *wild-type* no. Como consecuencia éstos ratones *knockout* desarrollan fibrosis severas y progresivas en diferentes tejidos. [30] Se ha encontrado por

PCR en tiempo real que entre las MT-MMPs la MT1-MMP es la enzima más expresada en pulmones con FPI y controles. Su localización celular ha sido examinada por inmunohistoquímica y se encontró principalmente en células epiteliales alveolares hiperplásicas e hipertróficas. Además se observó en células endoteliales. Sin embargo, en el epitelio de pulmones normales apenas fue detectada. De igual forma al medir la expresión por PCR en tiempo real de ésta enzima en fibroblastos de pulmones sanos y con FPI, presentó una expresión elevada. [35] En el presente estudio la expresión de la MMP-14 por PCR en tiempo real se vio incrementada en los pulmones de ratones tratados con bleomicina a los 7 días, 1 mes, y 2 meses con respecto al control. Es muy probable que la MT1-MMP participe activamente en la remodelación durante la fibrosis pulmonar, lamentablemente todavía no se conocen bien los mecanismos por los que esta proteasa interactúa con otras MMPs y TIMPs para activar a otras moléculas, lo que podría ayudar al entendimiento de la FP.

Los **TIMPs** son los principales reguladores endógenos de las actividades de las MMPs en el microambiente pulmonar. Cada inhibidor se une no covalentemente a una MMP con una estequiometría 1:1. Los miembros de la familia TIMP se distinguen por las diferencias en la inhibición de las MMPs, en su regulación transcripcional y en sus patrones de expresión. Además, se ha demostrado que los TIMPs poseen funciones biológicas que son independientes de su actividad inhibitoria de MMPs, incluyendo la estimulación de la proliferación celular, inducción o inhibición de la apoptosis, e inducción de la expresión *in vivo* de MMPs. La señalización de TGF- β 1 juega un papel fundamental en el depósito de la MEC en fibroblastos, estimulando la producción de colágenas y otras proteínas de la MEC e inhibiendo la degradación de la matriz. Los efectos negativos del TGF- β sobre la degradación de la MEC son mediados por la inhibición directa de la principal proteasa degradadora de matriz, la MMP-1 y por la estimulación de inhibidores endógenos de la MMP-1, incluyendo a TIMP-1. [42] Se sabe que el daño por bleomicina, prolonga e induce un incremento en la expresión de **TIMP-1** dentro del compartimiento alveolar. El RNAm del TIMP-1 y la proteína se encuentran marcadamente aumentadas en respuesta al daño pulmonar. La expresión génica de TIMP-1 está espacialmente restringida en áreas de daño pulmonar, y tanto en células del parénquima como células inflamatorias, se localiza dentro de zonas con

daño tisular, y asimismo estas células sirven como fuentes *in vivo* de TIMP-1 en el pulmón dañado. TIMP-1 es una proteína temprana regulatoria e importante potencialmente en las respuestas inflamatorias y fibróticas al daño pulmonar inducido por bleomicina. Estudios previos con modelos animales y con pacientes con FP han sugerido que el TIMP-1 puede estar involucrado en la patogénesis de la FP. Se ha encontrado que los niveles de RNAm de TIMP-1 están aumentados durante las primeras tres semanas después del daño con bleomicina en ratones. Sin embargo, los ratones deficientes en TIMP-1 desarrollan un daño pulmonar agudo manifestándose por una neutrofilia pulmonar aumentada, hemorragia y extravasación de macromoléculas de suero. El desarrollo del daño pulmonar agudo es específico de la deficiencia en TIMP-1 y sugiere que este inhibidor funciona para preservar la barrera alveolo-capilar. Las células parenquimatosas que carecen de TIMP-1 parecen ser las principales responsables en desarrollar la respuesta de daño agudo, indicando que la expresión de TIMP-1 por células estructurales pulmonares contribuye en limitar el daño agudo del pulmón. ^[39] Por hibridación *in situ* se ha observado que los macrófagos pulmonares son la fuente de este inhibidor después del daño con bleomicina. ^[36] Similarmente, por inmunohistoquímica de biopsias de pulmones obtenidas de pacientes con FPI demostraron que la localización de la proteína TIMP-1 es en macrófagos alveolares. También los fibroblastos pueden ser la fuente celular de TIMP-1 en pulmones fibróticos. ^[37] Asimismo se ha encontrado por PCR en tiempo real que la expresión de este inhibidor se incrementa en el modelo de fibrosis inducida por paraquat e hiperoxia en ratas. ^[38] En nuestro estudio, también observamos que la expresión de TIMP-1, en los pulmones de ratones tratados con bleomicina, a los 7 días, 1 mes y 2 meses, se elevó, cabe destacar que esta expresión estuvo incrementada en paralelo con el desarrollo de la fibrosis; y una disminución de su expresión claramente evidente a 3 y 4 meses, coincidiendo con la fase de resolución de la fibrosis. TIMP-1 es un importante modulador de eventos que permiten la remodelación de la MEC de pulmones dañados por bleomicina. La acumulación drástica y prolongada de TIMP-1 podría regular la respuesta inflamatoria así como la remodelación de los componentes de la MEC después de algún daño al pulmón.

VI. Conclusión

La expresión de las metaloproteasas de matriz y de los inhibidores tisulares de metaloproteasas se encuentra perfectamente regulada, además de ser compleja; por lo que todavía no se comprenden con claridad los mecanismos en los que participan éstas moléculas, incluyendo la remodelación de la matriz extracelular, el cual es un proceso íntimamente ligado al desarrollo de la fibrosis pulmonar. En el presente trabajo se midió por PCR cuantitativo la expresión de MMP-7, MMP-8, MMP-14, MMP-19 y TIMP-1 en el modelo de FP inducida por bleomicina hasta un periodo de 4 meses, y encontramos que:

- La expresión de MMP-7 presentó un aumento a 1 y 2 meses post-tratamiento. Sin embargo, los niveles de expresión de MMP-7 regresaron a los niveles basales a los 3 y 4 meses post-bleomicina
- La expresión de MMP-8 aumentó después de 7 días, 1 mes y 2 meses del tratamiento con bleomicina; y tuvo una disminución de su expresión a 3 y 4 meses.
- La expresión de MMP-14 se elevó a 7 días, 1m y 2m post-tratamiento. Sin embargo, su expresión disminuyó a los 3 meses post-bleomicina.
- No se encontraron cambios en la expresión de MMP-19 durante el curso temporal.
- La expresión de TIMP-1 aumentó a 7 días, 1 mes y 2 meses; y disminuyó durante los periodos de 3 y 4 meses post-instilación.

VII. Bibliografía

- [1] Hanley ME y Welsh CH. 2004. Diagnóstico y tratamiento de enfermedades pulmonares. México D.F., editorial el manual moderno. págs. 527.
- [2] Selman, M. & Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder, *Resp Research*. 3: 1-8, (2002).
- [3] Pardo, A. & Selman, M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis, *Front Biosci*. 7: 1743-1761, (2002).
- [4] Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis, *Int J Biochem Cell Biol*. 34: 1534-1538, (2002).
- [5] Selman, M., King, T. E., Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy, *Ann Int Med*. 134: 136-151, (2001).
- [6] Ramos C, Montañaño M, García-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, and Pardo A. Fibroblast from Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Normal Lungs Differ in Growth Rate, Apoptosis, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Expresion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 24: 591-598, (2001).
- [7] Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, et al, 2002, *Biología Molecular de la Célula*, 3ª edición, España, págs. 1385.
- [8] Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted, *Physiol Rev*. 87: 69-98, (2007).
- [9] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 1-12, (2005).
- [10] Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 48: 411-424, (2004).
- [11] Nagase H & Visse R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circ Res* 92: 827-839, (2003).
- [12] Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 4: 216, (2003).
- [13] Pardo, A. & Selman, Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling, *Proc Am Thorac Soc* 3: 383-388, (2006).
- [14] Mott JD & Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 558-564, (2004).
- [15] Brinckerhoff CE & Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 207-213, (2002).

- [16] Yan C & Boyd DD. Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression. *J Cell Physiol* 211: 19-26, (2007).
- [17] Varga J, Brenner DA, Phan SH., 2005, Fibrosis research: methods and protocols. EUA, págs. 251-259.
- [18] Cabrera S. Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar, *Rev Inst Nal Enf Resp.* 19: 53-61, (2006).
- [19] Pardo A, Selman M, and Kaminski N. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* doi:10.1016/j.biocel.2007.11.020 (2008).
- [20] 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, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans, *Proc Natl Acad Sci* 99: 6292–6297, (2002).
- [21] Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, Ramírez R, Jara P, D'Armiento J, Richards T, Selman M, Pardo A. Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin, *Int J Biochem Cell Biol.* (2007).
- [22] Brass DM, Tomfohr J, Yang IV, Schwartz DA. Using mouse genomics to understand idiopathic interstitial fibrosis, *Proc Am Thorac Soc.* 4: 92-100, (2007).
- [23] Valasek MA & Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 29: 151-159, (2005).
- [24] Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 188-198, (2006).
- [25] Gueders MM, Balbin M, Rocks N, Foidart JM, Gosset P, Louis R, Shapiro S, Lopez-Otin C, Noël A, and Cataldo DD. Matrix Metalloproteinase-8 Deficiency Promotes Granulocytic Allergen-Induced Airway Inflammation. *J Immunol.* 175: 2589-2597, (2005).
- [26] Gutiérrez-Fernández A, Inada M, Balbín M, Fueyo A, Pitiot AS, Astudillo A, Hirose K, Hirata M, Shapiro SD, Noël A, Werb Z, Krane SM, López-Otín C, and Puente XS. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *FASEB J.* 21: 2580-2591, (2007).
- [27] Jost M, Folgueras AR, Frérart F, Pendas AM, Blacher S, Houard X, Berndt S, Munaut C, Cataldo D, Alvarez J, Melen-Lamalle L, Foidart JM, López-Otín C, and Noël A. Earlier Onset of Tumoral Angiogenesis in Matrix Metalloproteinase-19-Deficient Mice. *Cancer Res* 66: 5234-5241, (2006).
- [28] Pendás AM, Folgueras AR, Llano E, Caterina J, Frérard F, Rodríguez F, Astudillo A, Noël A, Birkedal-Hansen H, and López-Otín C. Diet-Induced Obesity and Reduced Skin Cancer Susceptibility in Matrix Metalloproteinase 19-Deficient Mice. *Mol Cell Biol* 24: 5304-5313, (2004).

- [29] Hieta N, Impola U, López-Otín C, Saarialho-Kere U, and Kähäri VM. Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Dermal Wounds and by Fibroblasts in Culture. *J Invest Dermatol* 121: 997-1004, (2003).
- [30] Holbeck K, Bianco P, Yamada S, and Birkedal-Hansen H. MT1-MMP: a Tethered Collagenase. *J Cell Physiol* 200: 11-19, (2004).
- [31] Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, and Tryggvason K. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1. *Proc Natl Acad Sci* 97: 4052-4057, (2000).
- [32] Atkinson JJ, Holmbeck K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Parks WC, and Senior RM. Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Is Required for Normal Alveolar Development. *Developmental Dynamics* 232: 1079-1090, (2005).
- [33] Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, and Okada Y. Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Digests Interstitial Collagens and Other Extracellular Matrix Macromolecules. *J Biol Chem* 272: 2446-2451, (1997).
- [34] Osenkowski P, Toth M, and Fridman R. Processing, Shedding, and Endocytosis of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Physiol* 200: 2-10, (2004).
- [35] García-Alvarez J, Ramirez R, Sampieri CL, Nuttall RK, Edwards DR, Selman M, and Pardo A. Membrane type-matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 23: 13-21, (2006).
- [36] 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).
- [37] 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: 562-574, (2000).
- [38] Ruiz V, Ordóñez RM, Berumen J, Ramírez R, Uhal B, Becerril C, Pardo A, and Selman M. Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 285: 1026-1036, (2003).
- [39] Kim KH, Burkart K, Chen P, Frevert CW, Randolph-Habecker J, Hackman RC, Soloway PD, and Madtes DK. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Deficiency Amplifies Acute Lung Injury in Bleomycin-Exposed Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 271-279, (2005).
- [40] Selman M, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, Cisneros J, Gaxiola M, et al. Accelerated Variant of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical Behavior and Gene Expression Pattern. *PLoS ONE*, 2, e482 (2007).
- [41] Selman M, and Pardo A. Role of Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* 3: 364-372, (2006).

[42] Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, Pettus B, Hannun YA, Obeid L, and Trojanowska M. Sphingosine Kinase 1 (SPHK1) Is Induced by Transforming Growth Factor- β and Mediates TIMP-1 Up-regulation. *J Biol Chem* 279: 53994-54001, (2004).

[43] García-Alvarez J, Ramirez R, Checa M, Nuttall RK, Sampieri CL, Edwards DR, Selman M, and Pardo A. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Is Up-regulated by Transforming Growth Factor- β 1 In Vitro and Expressed in Fibroblastic Foci In Vivo In Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Experimental Lung Research* 32: 201-214, (2006).

[44] Salonurmi T, Parikka M, Kontusaari S, Pirilä E, Munaut C, Salo T, and Tryggvason K. Overexpression of TIMP-1 Under the MMP-9 Promoter Interferes with Wound Healing in Transgenic Mice. *Cell Tissue Res* 315: 27-37, (2004).

[45] Morey JS, Ryan JC, and Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol. Proced. Online* 8: 175-193, (2006).