



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

VARIACIONES GENÉTICAS EN EL PROMOTOR DE MMP-1 Y SU RELACIÓN CON LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

BIOL. MARCO ANTONIO CHECA CARATACHEA

TUTOR:
DRA. ANNIE PARDO SEMO

COMITÉ TUTORAL:
DR. MOISES SELMAN LAMA
DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Éste estudio fue realizado con financiamiento
de CONACYT. PAPIIT IN200106, y
SDI.PTID.05.6. MC was funded by CONACYT.**

**Así como la beca otorgada al alumno
por parte de CONACYT.
Becario # 186049**

AGRADECIMIENTOS

Al amor de mi vida

Gracias por todo lo que has venido a dar a mi vida, eres una persona increíble, que día a día aprendo a amarte más.

Tu has formado parte de este proceso desde un principio, y gran parte de este logro te lo debo a ti, y a tu amor.

Gracias por todas las sonrisas.

Te amo mucho mi linda esposa, Myrna.

Al fruto de nuestro amor

Aún no llegan a nuestras vidas y los amamos más que a nada, esto va por ti mi bebe hermoso.

A mis padres

Todos las enseñanzas y “regaños” se los voy a agradecer toda la vida, gracias por siempre al pendiente de mi y de mis hermanitas.

A ti mama por que sabes que eres la gran responsable de no desviar mi camino.

A mi padre por ser mi mejor amigo, y por ser un ejemplo a seguir.

***Los amo mucho
(Ya viveron para nosotros,
ahora nos toca vivir para ustedes)***

A mis hermanas lindas

Anayeli y Karen

*Gracias por todos los días que pasamos juntos,
los juegos y peleas, día a día pienso y me preocupo por ustedes.
Las amo y extraño mucho.*

Aarón

Siempre te vamos a querer como si fueras otro de nuestros hijos.

Oscar

*Gracias por tu amistad y por cuidar de mi hermana, sobrino y
familia .Eres una gran persona.*

A mi familia extendida

*A mis suegros, **Maru y Don Urbano**, que siempre nos han brindado su apoyo
y cariño, gracias por permitirme formar parte de su familia.*

*A mi amigo y cuñado **Pepe**, que más que agradecer me gustaría
felicitar por sus logros. Te va a ir super bien, no desesperes nunca.*

A la Dra. Annie Pardo, mi tutor principal

*Gracias por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.
Por todos los conocimientos y el apoyo brindado en mi formación académica.
Mi admiración y respetos Doctora.*

**Dr. Moisés Selman y Dra. Vilma Maldonado,
miembros de mi comité tutorial**

*En especial al Dr. Selman por sus aportes al presente trabajo,
y por todo el apoyo que he recibo de su parte*

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO,
Y AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS.**

Gracias por todo lo que me ha dado.

A mis amigos y miembros de laboratorio

*Carolina Gracia de Alba, Ignacio Paramo, Erika López, Anita Vega, Diego Limón,
Eduardo Montes, José Cisneros, Iliana Herrera, Marta Montaña, Diana Lezcano.*

Gracias por brindarme su amistad.

Un agradecimiento especial a mi amigo **Victor Ruíz** por su confianza y amistad,
te he aprendido mucho. Eres una gran persona y mejor amigo.
De igual forma a mis amigos **Arnoldo Aquino** y **Rafael Reynoso**, los cuales han
formado parte de mi formación desde mi llegada al INER.
Gracias por su amistad y apoyo incondicional.

Los quiero mucho

MMP-1 polymorphisms and the risk of idiopathic pulmonary fibrosis

Marco Checa · Víctor Ruiz · Martha Montaña ·
Rafael Velázquez-Cruz · Moisés Selman · Annie Pardo

Received: 20 August 2008 / Accepted: 8 October 2008 / Published online: 14 October 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and progressive fibrotic lung disorder of unknown etiology and unclear pathogenesis. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) is strongly upregulated and may contribute to the abnormal remodeling that characterizes the disease. We conducted a case–control study of 130 IPF patients and 305 healthy controls to investigate associations between two polymorphisms of the MMP-1 gene promoter and IPF risk. First, using PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis we studied the 2G polymorphism at $-1,607$, shown previously to generate the core of an AP-1 binding site and correlate with high transcriptional activity and risk for IPF. The frequency of the 2G/2G genotype was higher in IPF than in controls (63 vs. 49%; $P < 0.008$; OR = 1.7; CI 1.15–2.79). Next, we studied a T/G SNP at position -755 , which we identified by sequencing the MMP-1 promoter. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay performed on IPF fibroblasts with either -755 genotype revealed an AP-1 binding site for TT⁻⁷⁵⁵ and GT⁻⁷⁵⁵ genotypes. The frequency of this SNP revealed no signifi-

cant differences between IPF and healthy controls. However, when the study individuals were stratified by their smoking status, a significant increase in the T/T genotype frequency was observed in smoking cases compared with smoking controls (45 vs. 26%; $P = 0.03$; OR = 2.3; CI 1.15–4.97). These findings indicate that polymorphisms of the MMP-1 promoter may confer increased risk for IPF and reveal a putative gene–environment interaction between the -755 MMP-1 polymorphism and smoking in this disease.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and fatal lung disease of unknown etiology. It is characterized by aberrant epithelial activation, fibroblastic foci formation, and progressive lung scarring that together lead to abnormal gas exchange (Selman et al. 2001, 2006; Hunninghake et al. 2007). Despite numerous studies, the pathogenic mechanisms implicated in the development of IPF are presently unknown. Recent findings have shown that, despite progressive scarring, a number of matrix metalloproteinases (MMPs) are upregulated at the transcriptional and protein levels indicating that MMPs may play a role in the abnormal remodeling that characterizes the disease (Pardo et al. 2006; Selman et al. 2000, 2006; Zuo et al. 2002; Pardo et al. 2008).

MMPs (also called matrixins) belong to a large family of peptidases consisting of 23 members. MMPs have long been associated with tissue remodeling and influence cell behavior, survival, and death. They are able to cleave the protein components of extracellular matrix and also proteolytically activate highly selective mediators, such as growth factors and cell surface receptors (Pardo et al. 2006; López-Otín et al. 2007). MMP-1 (also known as collagenase-1) is

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements to obtain the Ph.D. degree for M. Checa at Universidad Nacional Autónoma de México.

M. Checa · A. Pardo (✉)
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma
de México, Apartado Postal 21-630, Coyoacán,
Mexico DF CP 04000, Mexico
e-mail: apardos@servidor.unam.mx

V. Ruiz · M. Montaña · M. Selman
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael
Cosío Villegas, Mexico DF, Mexico

R. Velázquez-Cruz
Instituto Nacional de Medicina Genómica,
Mexico DF, Mexico

the prototype of some of the MMPs capable of degrading fibrillar collagens types I, II, and III. MMP-1 like many other MMPs is undetectable in normal resting tissues and is mainly expressed during physiological and pathological tissue remodeling *in vivo* suggesting a wide role in biology (Pardo et al. 2005).

The MMP-1 gene contains consensus sequences for DNA-binding proteins such as AP-1, AP-2, Ets/PEA-3, as well as responsive elements to glucocorticoids, retinoic acid, and cyclic AMP (Rutter et al. 1997). There is evidence to indicate that a functional polymorphism in the MMP-1 gene promoter that consists of a guanosine (G) insertion at position –1,607 generates a new 5'-GGA-3' core recognition sequence for members of the Ets family of transcription factors (Rutter et al. 1998). Importantly, the 2G genotype displays significantly higher transcriptional activity in normal and malignant cells compared to cells possessing the 1G allele (Rutter et al. 1998; Wyatt et al. 2002).

Given the prominent upregulation of this enzyme in IPF lungs, the purpose of our study was to examine this promoter polymorphism in a cohort of IPF patients. Our results showed that the frequency of the 2G/2G genotype is increased in this disease. In addition, by sequencing the MMP-1 promoter region we identified a new polymorphism at position –755 (G/T) that creates a potential binding site for transcription factors of the activation protein-1 (AP-1) family and thus may influence the transcriptional responsiveness of the MMP-1 promoter. We found that the TT genotype is increased in cigarette smoking IPF patients indicating a potential gene–environment interaction between the –755 MMP-1 polymorphism and smoking in IPF.

Patients and methods

One-hundred and thirty unrelated IPF patients were included in this study. Diagnosis of IPF (67 males, 63 females, 62.5 ± 9.6 years old) was supported by history, physical examination, pulmonary function studies, HRCT, and bronchoalveolar lavage findings (American Thoracic Society 2000). In 40% of the patients diagnosis was confirmed by morphology (open lung biopsy) based on typical microscopic findings of usual interstitial pneumonia (Katzstein et al. 1998). In the absence of biopsy, patients had to fulfill the criteria of the ATS/ERS international consensus (American Thoracic Society 2000). Patients with known causes of interstitial lung disease (i.e. collagen vascular disease, drug toxicity, environmental exposure), were excluded. Clinical data, including smoking status were extracted from case records. Smoking status was characterized as “never”, “former” (patients who stopped smoking at least 12 months before presentation), or “current” (patients

who were either still smoking or stopped smoking less than a year before presentation) (Selman et al. 2007). Smoking index (packs/year) was also documented.

The control group was comprised of 305 unrelated healthy subjects (189 males, 116 females, 40.6 ± 12.4 years old). Forty-nine IPF patients and 107 controls were former or current smokers. Patients and controls were individuals with the same ethnic origin and with at least two generations born in Mexico. The protocol was approved by the Ethics Committee of the National Institute of Respiratory Diseases, México. All patients and control subjects were informed of the purpose of the study and their consent obtained.

DNA extraction and MMP-1 genotyping assays

Genomic DNA was extracted from 10 ml of peripheral blood using the BD genomic DNA isolation kit (Maxim Biotech, San Francisco CA). The polymorphic site –1,607 of the MMP-1 promoter was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). For each polymorphism, a DNA sequence containing the polymorphic site was amplified by PCR. The PCR primers used for amplifying a fragment of 269 bp for the polymorphism at –1,607 (G > GG) were:

Forward: 5'-TGACTTTTAAACATAGTCTATGTTCA-3'

Reverse: 5'-TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAGC-3'. The reverse primer was designed to introduce a recognition site for the restriction enzyme AluI (AGCT) by replacing a T with a G at the second position close to the 3' end of the primer. The 1G allele has this recognition site, but in the 2G allele this recognition site is destroyed by the insertion of a guanine (Zhu et al. 2001).

The PCR primers used for amplifying a fragment of 120 bp for the SNP at –755 (G > T) were: Forward: 5'-GATCCTCCACCTCAGCCTCTCCG-3' Reverse: 5'-CATGGTGAGACCCCATCTCT-3'. The forward primer was designed to introduce a recognition site for the restriction enzyme MspI (CCGG) by replacing an A with a C at the second position close to the 3' end of the primer. The G allele has this recognition site, whereas the T allele lacks this.

PCR was performed in a 25 μ l final volume containing 20 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 1 \times Taq DNA polymerase buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM of each primer and 2.5 U of recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen, CA). The PCR conditions were 2 min at 94°C followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 64°C, and 30 s at 72°C, and with a final step at 72°C for 7 min. Cycling was carried out in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA).

The restriction endonucleases used were AluI (for –1,607 G > GG), and MspI (for –755 G > T). A 15- μ l aliquot of PCR product was digested overnight at 37°C in a 20- μ l

reaction containing 10 units of restriction endonuclease (New England BioLabs, Beverly, MA) and 2 μ l reaction buffer. After overnight digestion, the products were resolved on a 4% agarose gel stained with ethidium bromide. After electrophoresis, the homozygous 2G/2G alleles at $-1,607$ were represented by a DNA band with a size of 269 bp, whereas the homozygous 1G/1G alleles were represented by DNA bands with sizes of 241 and 28 bp. The heterozygote (2G/1G) displayed a combination of both alleles (269, 241, and 28 bp).

For the SNP at -755 , the homozygous T/T alleles were represented by a DNA band with a size of 120 bp, whereas the homozygous G/G alleles were represented by DNA bands with sizes of 97 and 23 bp. The heterozygote (T/G) displayed a combination of both alleles (120, 97 and 23 bp).

To validate this method, 20 representative gel-purified PCR products (Qiagen PCR purification kit) were directly sequenced by a sequencer (Prism 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, CA), and the results were concordant.

DNA sequencing

In search for other possible functional SNPs, the complete promoter region of the MMP-1 gene was sequenced in pooled DNA obtained from ten Mexican subjects, by the cycle-sequencing method, using a BigDye Terminator, v. 3.1, sequence kit, and was analyzed on an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA). The gene sequence obtained was then analyzed using Chromas software.

We found a SNP at -755 bp that is a substitution of G by T. For this SNP an AP-1 binding site was predicted to be present in the T allele when possible transcription factor binding sites were examined with the TRANSFAC (Transcription Factor Database, <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) program.

Cell culture

Lung fibroblasts were derived from IPF lung tissues obtained by open lung biopsy. Lung fibroblasts were isolated by trypsin dispersion, and cells were cultured at 37°C in 5% CO₂-95% air containing Ham's F-12 medium (GIBCO BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO BRL) and 100 U/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin, and 2.5 mg/ml of amphotericin B. Eight cell lines were explored to identify the presence of -755 TT, -755 GT, and -755 GG genotypes were used.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Chromatin immunoprecipitation assay was performed according to the manufacturer's protocol (ChIP assay kit by

Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Briefly, 1.5×10^7 fibroblasts were grown on 100 mm dishes. Formaldehyde was added to the medium to a final concentration of 1% for cross-linking at room temperature for 10 min. Cells were washed with cold PBS containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride PMSF, 1 μ g/ml aprotinin and 1 μ g/ml pepstatin A) and pelleted by centrifugation. Cell pellets were then lysed in SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.1, with proteases inhibitors mentioned above). After 10 min incubation on ice, cells were sonicated to shear DNA to lengths between 200 and 1,000 base pairs. Samples were then immunoprecipitated with 10 μ l c-Jun monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) according to the specifications provided by the vendor (Upstate Biotech).

ChIP PCR analysis was done by using 5 μ g of ChIP DNA and the appropriate primers to amplify the region -825 to -631 of the MMP-1 promoter. The expected PCR product was 195 bp. PCR was performed in a 25 μ l final volume containing 5 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 1 \times *Taq* DNA polymerase buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM of each primer and 2.5 U of recombinant *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, CA).

The PCR conditions were 2 min at 94°C followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C, and with a final step at 72°C for 7 min. Cycling was carried out in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA). PCR products were electrophoresed on 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide.

Real time PCR

Total RNA was extracted from lung fibroblasts using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) and reversed transcribed into cDNA (Advantage RT-for-PCR Kit; Clontech, Palo Alto, CA) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR amplification was performed using i-Cycler iQ Detection System (BioRad, Hercules, CA), using TAQMAN probes (PE Applied Biosystems, Wellesley, CA) labeled with FAM (Hs00899660_g1 for MMP-1 and eukaryotic 18S rRNA endogenous control). Standard curves were calculated referring the threshold cycle (C_t) to the log of each cDNA dilution step as previously described (Pardo et al. 2005). Results are expressed as the number of copies of the target gene normalized to 18S rRNA.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SD. Mantel-Haenszel chi square test was used to determine the significance of the association between MMP-1 promoter genotypes and IPF (Epi Info v6.04b; Stone Mountain, GA). Associations

between IPF and MMP-1 genotypes were estimated using odds ratio (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs). Adjustment for multiple tests was made by multiplying the *P* value by the number of SNPs (Bonferroni method). *P* < 0.05 was considered statistically significant. Conformance of the allele frequencies with the Hardy–Weinberg equilibrium was tested using a Fisher's exact test.

Results

Genotype and allele frequency of the –1,607 MMP-1 promoter polymorphism

This case/control study included 130 patients with IPF and 305 normal controls. The distribution of the MMP-1 –1,607 allele and genotype frequencies for cases and controls are shown in Table 1. The percent of the 2G/2G genotype in IPF patients was significantly higher than that in controls (63 vs. 49%; *P* < 0.008). This finding indicates that the 2G/2G genotype carriers may display an elevated risk for developing IPF (OR = 1.7; CI 1.15–2.79). Allelic analysis also showed a significant increase in the frequency of the 2G allele in the patients group (*P* = 0.006; OR = 1.6, CI 1.13–2.29), while the frequency of the 1G allele was considerably lower (*P* = 0.006, OR = 0.62, CI 0.44–0.88).

Characterization and analysis of the –755 (G/T) MMP-1 promoter polymorphism

Sequencing of the complete MMP-1 promoter revealed a T/G SNP at nucleotide position –755. When this SNP was evaluated for possible transcription binding sites using the Transcription Factor Database (TRANSFAC) program, an AP-1 binding site was predicted to be present in the T allele (Fig. 1).

To corroborate this potential binding activity at position –755, we performed a ChIP assay using lung fibroblasts from IPF patients with the TT^{–755}, GT^{–755}, and the GG^{–755} genotypes. After formaldehyde cross-linking, chromatin immunoprecipitation was performed with an antibody against AP-1. The precipitated DNA was subjected to PCR

with the use of specific primers for the MMP-1 promoter region that were located between nucleotides –825 and –631. PCR characterization of the precipitated DNA revealed an association of the MMP-1 promoter at –755 bp with AP-1 in the lung fibroblasts that have the T allele (Fig. 2, cells with T/T and G/T genotypes), whereas no amplification was observed in the immunoprecipitated chromatin from cells with the G/G genotype (Fig. 2). In the negative control (PCR without antibody) no amplification was detected (IgG). Only the total input sample gave a clear PCR signal, confirming that AP-1 is specifically bound to the promoter.

The frequency of –755 G/T polymorphism is increased in smoker IPF patients

When we examined the frequency of the –755 G/T MMP-1 polymorphism using our entire study group of cases (*n* = 130) and controls (*n* = 305) we found no significant differences between IPF and healthy controls (Table 2). However, as illustrated in Table 3, when we stratified them by their smoking status, a significant increase in the genotype frequency of the T/T polymorphism was observed in the smoking cases compared with the smoking controls (45 vs. 26%; *P* = 0.03; OR = 2.3; CI 1.15–4.97). A significant increase in the frequency of T allele was also observed in the smoking cases (68 vs. 48%; *P* = 0.03; OR = 1.68, CI 1.01–2.74). When we compared the frequency of the –755 T/T genotype in the IPF cohort, a significant increase was observed in the smoker IPF patients [45 vs. 12% in non-smoker IPF (*P* = 0.00007)]. Consequently, the T allele was also significantly increased in smokers IPF (68 vs. 33%; *P* = 0.00002). In contrast, no differences were found in the control population (T/T genotype 26% in smokers versus 21% in non-smokers).

Haplotype analysis of –1,607 and –755 polymorphic loci

Analysis of haplotypes of the two polymorphic loci (–1,607 and –775) showed a marginal but significant increase of the 1G/1G^{–1,607}–G/T^{–755} haplotype in the con-

Table 1 Genotype and allele frequencies of the MMP1 –1,607 polymorphism in cases and controls and their association with risk of IPF

| MMP-1 genotype | IPF patients <i>n</i> = 130 | | Controls <i>n</i> = 305 | | pC | OR | CI (95%) |
|----------------|-----------------------------|--------|-------------------------|--------|--------------|-------------|------------------|
| | No. | Freq. | No. | Freq. | | | |
| –1,607 1G/2G | | | | | | | |
| 1G/1G | 10 | (0.08) | 36 | (0.12) | 0.23 | | |
| 1G/2G | 38 | (0.29) | 119 | (0.39) | 0.10 | | |
| 2G/2G | 82 | (0.63) | 150 | (0.49) | 0.008 | 1.79 | 1.15–2.79 |
| Alleles | | | | | | | |
| 1G | 58 | (0.22) | 191 | (0.32) | 0.006 | 0.62 | 0.44–0.88 |
| 2G | 202 | (0.78) | 419 | (0.68) | 0.006 | 1.61 | 1.13–2.29 |

pC *P* value with Bonferroni correction, *OR* odds ratio, *CI* confidence interval
Bold values indicate statistically significant results

Fig. 1 Analysis of binding sites in the -755 promoter region using the TRANSFAC software. **a** Sequence of the G allele. **b** Sequence of the T allele; an AP-1 binding site is shown. *Black arrow* points at the single nucleotide polymorphism, G in **a** and T in **b**

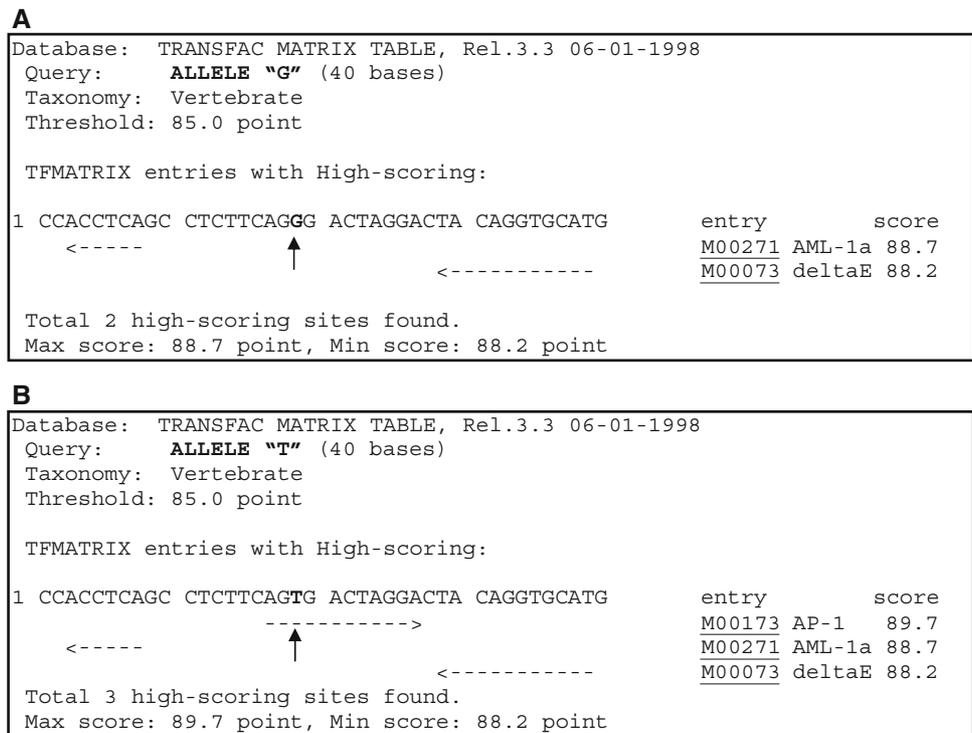
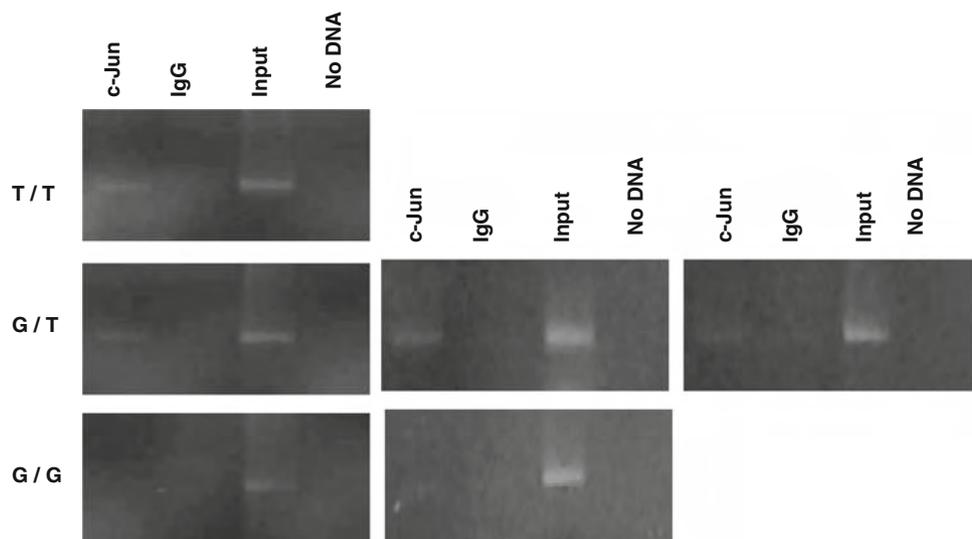


Fig. 2 Analysis of the AP-1 site-specific binding activity by chromatin immunoprecipitation and PCR. Chromatin from lung fibroblast cell cultures from IPF patients with the T/T, G/T (three different cell lines), and G/G (two different cell lines) genotypes were used. Anti c-Jun antibody precipitates DNA fragments containing the T allele, but does not precipitate DNA fragments with the G/G genotype. Positive control: no immunoprecipitated chromatin (*input*). Negative control: samples immunoprecipitated with IgG



trol group [$P = 0.05$, OR = 0.14; CI 0.01–0.96 (Table 4)]. After adjustment for smoking, the haplotype $2G^{-1,607}-T^{-755}$ was significantly higher in smoker patients compared with smoker controls (33 vs. 24% $P = 0.04$; OR = 1.6; CI 1.12–3.4) (Table 5). Consequently, in the non-smoking group the frequency of the same haplotype was lower in IPF cases (0.24) than control group (0.37) ($P = 0.0009$, OR 0.57, CI, 0.41–0.80). Also, a higher frequency of the $2G^{-1,607}-G^{-755}$ haplotype was present in IPF non-smokers.

No significant deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium in the distribution of MMP-1 SNP genotypes in IPF patients and healthy controls were detected ($P < 0.05$).

In vitro baseline expression of MMP-1

Several IPF cell lines were explored searching for the different MMP-1 haplotypes. Only one 1G/1G at the $-1,607$ position was found. We examined MMP-1 expression in this cell-line compared with three fibroblasts lines that carried the 2G/2G polymorphism (Fig. 3). We found that in the only 1G/1G fibroblast line MMP-1 expression was lower than in the other three cell-lines carrying the 2G/2G. Interestingly, the presence of the -755 T allele was associated with a further increase of the MMP-1 expression (Fig. 3).

Table 2 Genotype and allele frequencies of MMP-1 –755 in cases and controls and their association with risk of IPF

| MMP-1 genotype | IPF patients <i>n</i> = 130 | | Controls <i>n</i> = 305 | | pC |
|----------------|-----------------------------|--------|-------------------------|--------|------|
| | No. | Freq. | No. | Freq. | |
| –755 G/T | | | | | |
| G/G | 50 | (0.38) | 98 | (0.32) | 0.31 |
| G/T | 48 | (0.37) | 140 | (0.46) | 0.10 |
| T/T | 32 | (0.25) | 67 | (0.22) | 0.51 |
| Alleles | | | | | |
| C | 58 | (0.69) | 191 | (0.32) | 0.82 |
| T | 202 | (0.31) | 419 | (0.68) | 0.82 |

pC P value with Bonferroni correction

Table 3 Risk of IPF related to MMP-1 –755 genotype by smoking

| Smokers | IPF patients <i>n</i> = 49 | | Controls <i>n</i> = 107 | | pC | OR | CI (95%) |
|----------|-------------------------------|---------|----------------------------|---------|-------------|-------------|------------------|
| | No. | (Freq.) | No. | (Freq.) | | | |
| –755 G/T | | | | | | | |
| G/G | 12 | (0.25) | 32 | (0.29) | 0.61 | | |
| G/T | 15 | (0.30) | 47 | (0.44) | 0.16 | | |
| T/T | 22 | (0.45) | 28 | (0.26) | 0.03 | 2.30 | 1.15–4.97 |
| Alleles | | | | | | | |
| G | 39 | (0.42) | 111 | (0.52) | 0.04 | 0.60 | 0.37–0.95 |
| T | 59 | (0.68) | 103 | (0.48) | 0.04 | 1.68 | 1.01–2.74 |

pC P value with Bonferroni correction, OR odds ratio, CI confidence interval

Bold values indicate statistically significant results

Discussion

IPF is a chronic, progressive, and often fatal form of interstitial lung disease, characterized by injury and activation of lung epithelial cells, fibroblastic foci formation and abnormal tissue remodeling. Although the primary contrib-

uting factors and the mechanisms involved in repair and remodeling have not been elucidated, recent work comparing IPF lungs with normal lungs or from other interstitial lung diseases have demonstrated that several MMPs, primarily MMP-1, are highly upregulated in IPF (Pardo et al. 2006; Selman et al. 2000, 2006; Zuo et al. 2002; Pardo et al. 2008). Moreover, it has been recently indicated that increased levels of circulating MMP-1 and MMP-7 may serve as molecular biomarkers for IPF, since both MMPs are able to distinguish patients with this disorder compared with normal subjects or patients with other chronic lung diseases (Rosas et al. 2008).

In the present study, we carried out a case/control association study to investigate the hypothesis that polymorphisms in the MMP-1 gene promoter associate with risk for IPF. The focus was on a –1,607 polymorphism and a newly discovered G/T polymorphism at –775. Our results showed that: (a) the 2G allele and the 2G/2G genotype at –1,607 associate with increased IPF risk; (b) the G/T SNP at –775 shows no association with IPF if smokers and non-smokers are grouped together but if separated then the TT genotype at –775 associates with increased risk for IPF in smokers; (c) in smokers the haplotype 2G/T associates with increased disease risk; and (d) the AP-1 factor may bind these or bind near these polymorphic sites. The observations may indicate that MMP-1 promoter polymorphisms associate with IPF via perhaps their interaction with AP-1. Moreover, one or both of –1,607 and –775 loci may be involved in gene–environment interactions that in turn modulate IPF susceptibility.

The frequency of the 2G/2G and 1G/1G genotypes were increased and decreased, respectively, in IPF cases indicating that this genotype may modulate susceptibility to IPF. Of interest, similar results have been found in chronic liver disorders where there were significantly more 2G homozygotes in patients with liver cirrhosis than in patients with chronic hepatitis C virus infection (Okamoto et al. 2005). It is well known that the 2G type of SNP at –1,607 in the

Table 4 Individual haplotypes of MMP-1 promoter in cases and controls and their association with risk of IPF

| MMP-1 –1,607/–755 haplotype | IPF patients <i>n</i> = 130 | | Controls <i>n</i> = 305 | | pC | OR | CI (95%) |
|-----------------------------|--------------------------------|---------|----------------------------|---------|------|------|-----------|
| | No. | Freq. | No. | Freq. | | | |
| 1G 1G/G G | 3 | (0.025) | 2 | (0.005) | | | |
| 1G 2G/G G | 6 | (0.05) | 16 | (0.052) | | | |
| 2G 2G/G G | 41 | (0.316) | 64 | (0.210) | | | |
| 1G 1G/G T | 1 | (0.008) | 18 | (0.058) | 0.05 | 0.14 | 0.01–0.96 |
| 1G 2G/G T | 20 | (0.158) | 55 | (0.181) | | | |
| 2G 2G/G T | 27 | (0.208) | 76 | (0.251) | | | |
| 1G 1G/T T | 8 | (0.058) | 17 | (0.058) | | | |
| 1G 2G/T T | 14 | (0.108) | 39 | (0.128) | | | |
| 2G 2G/T T | 10 | (0.075) | 18 | (0.058) | | | |

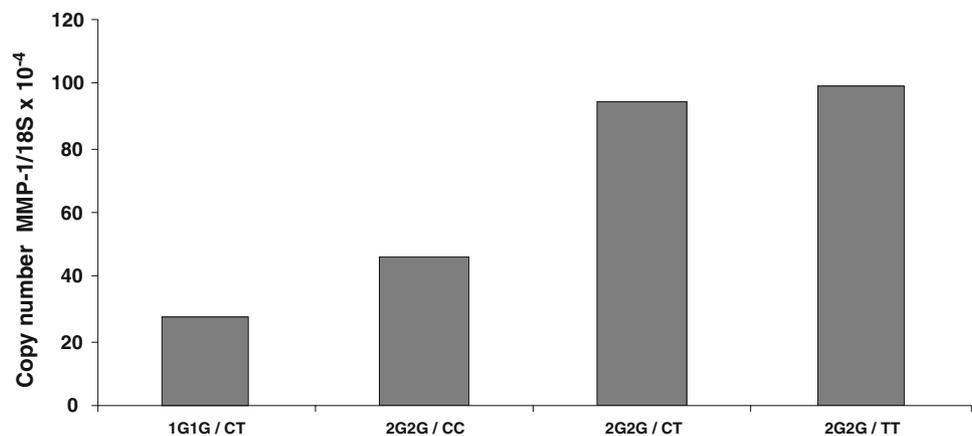
pC P value with Bonferroni correction, OR odds ratio, CI confidence interval

Table 5 Risk of extended haplotypes of MMP-1 by smoking

| MMP-1 -1,607/-755 haplotype | IPF patients <i>n</i> = 130 (Freq) | Controls <i>n</i> = 305 (Freq) | <i>p</i> C | OR | CI (95%) |
|-----------------------------|--|--------------------------------------|---------------|-------------|------------------|
| Smoking | | | | | |
| 1G/G | (0.10) | (0.14) | 0.09 | | |
| 2G/G | (0.32) | (0.35) | 0.48 | | |
| 1G/T | (0.25) | (0.27) | 0.64 | | |
| 2G/T | (0.33) | (0.24) | 0.04 | 1.60 | 1.12–3.40 |
| Non-smoking | | | | | |
| 1G/G | (0.11) | (0.09) | 0.60 | | |
| 2G/G | (0.54) | (0.39) | 0.004 | 1.87 | 1.38–2.54 |
| 1G/T | (0.11) | (0.15) | 0.055 | | |
| 2G/T | (0.24) | (0.37) | 0.0009 | 0.57 | 0.41–0.80 |

*p*C *P* value with Bonferroni correction, *OR* odds ratio, *CI* confidence interval

Bold values indicate statistically significant results

Fig. 3 MMP-1 mRNA expression was analyzed by real-time RT-PCR and the 18S rRNA gene was used for normalization

promoter of MMP-1 creates a sequence, 5'-GGA-3', that is the core recognition sequence of the binding site for Ets family transcription factors. The promoter containing the 2G allele displays significantly higher transcriptional activity than the 1G promoter (Rutter et al. 1998). Our findings in few lung fibroblast cell-lines suggest that the 2G allele increases MMP-1 expression. More recent studies have shown that this polymorphism, together with an adjacent AP-1 binding site, significantly affects the induction of MMP-1 by hydrogen peroxide (Ranganathan et al. 2001), and that MMP-1 production is higher in human foreskin fibroblasts from 2G homozygotes than in those from 1G homozygotes when stimulated with epidermal growth factor or interleukin1 (Wyatt et al. 2002). Although the details as to how the 2G polymorphism may increase disease risk are not known, the available literature supports the notion that the 2G allele contributes to increased transcriptional activity of the MMP-1 promoter (perhaps by enabling AP-1 binding). The increased activity most likely results in increased protein levels that may have a negative impact on lung tissue remodeling and then this abnormality may enhance the risk for developing IPF.

A new single nucleotide genetic variant (G/T) at -755 of the MMP-1 promoter identified in the present study was shown to associate with the presence of IPF in smokers. The TT genotype appeared to be a risk factor for IPF in smokers. Cigarette smoking has been associated with IPF in a number of case-control studies with patients of different ethnic backgrounds as well as with patients with familial pulmonary fibrosis indicating that a history of ever smoking may confer increased risk for IPF (Taskar et al. 2006; Steele et al. 2005). In this context, our findings indicate that the -755 polymorphic site may modulate an interaction with smoking resulting in an increase in the susceptibility to develop the disease.

Similar results have been reported for this and other genes in other human diseases (Zhu et al. 2001). For example, it has been demonstrated that the MMP-1 -1,607 2G/2G genotype enhances lung cancer susceptibility especially in current smokers (Zhu et al. 2001). Likewise, Vitamin D receptor *Taq-I* TT polymorphism is associated with both the presence and the progression of periodontitis in smokers, while no association was detected in non-smoking individuals (Nibali et al. 2008). When the region containing the -775 polymor-

phism was subjected to analysis by the Transcription Factor Database Program, an AP-1 binding site was predicted in the T allele, which was corroborated by chromatin immunoprecipitation assay. Of interest, an AP-1 core recognition sequence was generated by the 2G allele at $-1,607$. Together these findings indicate that AP-1 may be an important factor in IPF pathogenesis especially in the context of the polymorphisms investigated in the present study.

Although the putative role of MMP-1 in IPF is unclear, it has been demonstrated that this enzyme is primarily expressed by the alveolar epithelial cells, but also by macrophages in smoker patients (Selman et al. 2000). MMP-1 specifically degrades fibrillar collagens, which are the major component of the lung extracellular matrix. Moreover, the identification of a large variety of non matrix substrates of MMPs, including of MMP-1 indicates that many molecular pathways may be involved. However, based on the present findings where alleles and haplotypes of the two MMP-1 polymorphic sites were shown to associate with susceptibility to IPF and along with the available literature, we postulate that both MMP-1 polymorphic sites ($-1,607$, -775) play an important role in IPF pathogenesis, probably via their ability to modulate transcriptional regulation where the AP-1 factor may be involved.

It is likely that gene–environment (smoking) interactions occur and that both of these polymorphisms modulate transcription via AP-1 involvement. A larger confirmatory study involving other populations is required to assess the population-specificity and the relative contribution of these polymorphisms to disease.

Acknowledgments This work was supported by Grants: Universidad Nacional Autónoma de México: PAPIIT IN200106, and SDI.PTID.05.6. MC was funded by CONACYT.

References

- American Thoracic Society (2000) Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 161:646–664
- Hunninghake GW, Schwarz MI (2007) Does current knowledge explain the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? A perspective. *Proc Am Thorac Soc* 4:449–452
- Katzenstein ALA, Myers JL (1998) Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathological classification. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1301–1315
- López-Otín C, Matrisian LM (2007) Emerging roles of proteases in tumor suppression. *Nat Rev Cancer* 7:800–808
- Nibali L, Parkar M, D'Aiuto F, Suvan JE, Brett PM, Griffiths GS, Rosin M, Schwahn C, Tonetti MS (2008) Vitamin D receptor polymorphism (-1056 *Taq-I*) interacts with smoking for the presence and progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 35:561–567
- Okamoto K, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I (2005) Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 20:1102–1108
- Pardo A, Selman M (2005) MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol* 37:283–288
- Pardo A, Selman M (2006) Matrix metalloproteases in the aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* 3:383–388
- Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards T, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N (2005) Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* 2(9):e251
- Pardo A, Selman M, Kaminski N (2008) Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1141–1155
- Ranganathan AC, Nelson KK, Rodriguez AM, Kim KH, Tower GB, Rutter JL, Brinckerhoff CE, Huang TT, Epstein CJ, Jeffrey JJ, Melendez JA (2001) Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H_2O_2 -dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 276:14264–14270
- Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, Lindell KO, Cisneros J, Macdonald SD, Pardo A, Sciruba F, Dauber J, Selman M, Gochuico BR, Kaminski N (2008) MMP-1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* 5(4):e93
- Rutter JL, Benbow U, Coon CI, Brinckerhoff CE (1997) Cell-type specific regulation of human interstitial collagenase-1 gene expression by interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human fibroblasts and BC-8701 breast cancer cells. *J Cell Biochem* 66:322–336
- Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE (1998) A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 58:5321–5325
- Selman M, Pardo A (2006) Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. From innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* 3:364–372
- Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A (2000) TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L562–L574
- Selman M, King TE, Pardo A (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134:136–151
- Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A (2006) Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 173:188–198
- Selman M, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, Cisneros J, Gaxiola M, Pérez-Padilla R, Navarro C, Richards T, Dauber J, King TE Jr, Pardo A, Kaminski N (2007) Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS ONE* 2(5):e482
- Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, Burch LH, Wahidi MM, Phillips JA III, Sporn TA, McAdams HP, Schwarz MI, Schwartz DA (2005) Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1146–1152
- Taskar VS, Coultas DB (2006) Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc* 3:293–298
- Wyatt CA, Coon CI, Gibson JJ, Brinckerhoff CE (2002) Potential for the 2G single nucleotide polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase to enhance gene expression in normal stromal cells. *Cancer Res* 62:7200–7202
- Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X (2001) A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 61:7825–7829
- 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 (2002) Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6292–6297

Tabla de contenidos

| | |
|---|----|
| Resumen | 4 |
| Introducción | 6 |
| Fibrosis Pumonar Idiopática | 6 |
| Figura 1. Mecanismos generales de la FPI | 11 |
| Metaloproteasas de matriz y sustratos de la matriz extracelular | 12 |
| Figura 2. Esquema de dominios de MMP | 15 |
| Tabla 1. Clasificación de metaloproteinasas de matriz | 16 |
| Colagenasas | 17 |
| Gelatinasas | 18 |
| Matrilisinas | 19 |
| Estromelisinias | 20 |
| MMP's tipo membrana (MT-MMP) | 21 |
| Otras MMP's | 21 |
| Regulación de las MMP's | 22 |
| Regulación transcripcional | 22 |
| Figura 3. Grupo de promotores de MMPs | 24 |
| Factores de transcripción AP-1 y regulación de MMPs | 26 |
| Factores de transcripción ETS y regulación de MMPs | 27 |
| Activación e inhibición de MMPs | 28 |

| | |
|--|----|
| Polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) | 30 |
| Figura 4. Clasificación de SNP's | 32 |
| Polimorfismos funcionales en los promotores de MMPs | 33 |
| MMPs y FPI | 34 |
| Metodología | 37 |
| Población de estudio | 37 |
| Determinación de genotipos | 38 |
| Extracción de ADN | 38 |
| Figura 5. Representación de genotipos | 41 |
| Secuenciación de ADN | 42 |
| Cultivo celular | 42 |
| Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) | 43 |
| PCR en tiempo real | 44 |
| Análisis estadístico | 45 |
| Resultados | 46 |
| Frecuencia génica y alélica del SNP -1607 del promotor de la MMP-1 | 46 |
| Tabla 1. Frecuencias génicas y alélicas del SNP -1607 en casos y controles | 47 |
| Caracterización y análisis del SNP -755 del promotor de la MMP-1 | 48 |
| Figura 6. Secuenciación del promotor de MMP-1 | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 7. Análisis de posibles sitios de unión a factores de transcripción | 49 |
| Figura 8. Análisis de la unión del factor de transcripción <i>AP-1</i> | 51 |
| Frecuencia génica y alélica del SNP -755 del promotor de la MMP-1 | 52 |
| Tabla 2. Frecuencias génicas y alélicas del SNP -755 en casos y controles fumadores | 52 |
| Análisis de haplotipos de los SNP -1607 y -755 | 53 |
| Tabla 3. Haplotipos individuales del promotor de MMP-1 en casos y controles | 54 |
| Tabla 4. Riesgo de haplotipos del promotor de MMP1 en fumadores | 55 |
| Expresión génica de MMP-1 | 56 |
| Figura 9. Expresión del ARN mensajero de MMP-1 | 56 |
| Discusión | 57 |
| BIBLIOGRAFIA | 62 |

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI), es una enfermedad pulmonar crónica y letal de etiología desconocida. Esta enfermedad se caracteriza por una activación epitelial aberrante, formación de focos de fibroblastos y una cicatrización progresiva del pulmón que conlleva a un intercambio gaseoso anormal. A pesar de múltiples estudios, se desconocen los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de dicha enfermedad. Hallazgos recientes han demostrado que diversas metaloproteinasas de matriz (MMPs) están sobre expresadas a nivel transcripcional y a nivel de proteína, indicando que estas enzimas podrían desempeñar un papel importante en la remodelación que caracteriza a la FPI. Las MMPs pertenecen a una amplia familia de peptidasas que incluyen 23 miembros. Estas enzimas se han relacionado ampliamente con la remodelación tisular, además de modular el comportamiento, sobrevivencia y muerte celular. Las MMPs son capaces de degradar los componentes proteicos de la matriz extracelular (MEC) y además tienen la capacidad de activar selectivamente y de una manera proteolítica a mediadores tales como factores de crecimiento y receptores de superficie. La MMP-1 es el prototipo estructural de las MMPs y es capaz de degradar colágena fibrilar tipo I, II y III. La enzima es indetectable en condiciones en las cuales el tejido se encuentra en reposo y su expresión se incrementa *in vivo* en condiciones de remodelación fisiológica o patológica del tejido.

La región promotora de esta enzima contiene secuencias consenso de unión a factores de transcripción tal como, AP-1, AP-2, Ets/PEA-3, así como elementos responsivos a glucocorticoides, ácido retinoico y AMP cíclico. Se ha descrito un polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) funcional en el promotor de la MMP-1 en la posición -1607, el cual consiste en la adición de una guanina, la cual crea un sitio de unión a un factor de transcripción de la familia Ets. Se ha demostrado que, células que contienen el alelo 2G muestra una actividad transcripcional más alta comparada con células portadoras del alelo 1G. Dada la sobreexpresión de esta enzima en pacientes con FPI, el propósito del presente trabajo fue examinar el polimorfismo en la posición -1607 de la región promotora de la MMP-1 en una cohorte de pacientes con FPI. Los resultados mostraron que la frecuencia del genotipo 2G/2G se encuentra incrementada en pacientes con FPI comparada con la población control. Adicionalmente, al secuenciar un fragmento de la región promotora de la MMP-1 identificamos un polimorfismo en la posición -755, el cual consiste en la sustitución de una guanina por una timina, que al ser examinado en un programa que predice posibles sitios de unión a factores de transcripción, se encontró un posible sitio de unión para el factor de transcripción *AP-1* (Activation protein-1) para el alelo T, el cual podría modular la actividad transcripcional de esta enzima. Por otra parte encontramos que el genotipo T/T de dicho SNP se encuentra incrementado en pacientes fumadores con FPI, indicando que podría existir una interacción gen-ambiente entre el polimorfismo -755 y pacientes fumadores con FPI.

Introducción

Fibrosis Pulmonar Idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar crónica, que pertenece a una familia de desordenes pulmonares, conocidos como enfermedades pulmonares intersticiales (ILD). Dentro de esta amplia categoría de enfermedades pulmonares difusas, la fibrosis pulmonar idiopática pertenece al subgrupo de neuropatías intersticiales idiopáticas (NII), que por definición, la etiología de las mismas es desconocida. Existen siete NII distintas, que se diferencian por características clínicas específicas (39) y dentro de esta categoría la FPI es la forma más agresiva, con un promedio de supervivencia de 3 años a partir de su diagnóstico (40).

El término “idiopática” se refiere, como se señaló anteriormente, a que no existen causas conocidas para el desarrollo de la enfermedad y los criterios para el diagnóstico de la FPI requieren por tanto la exclusión de causas conocidas de enfermedades pulmonares intersticiales. Sin embargo, en fechas recientes se ha sugerido que podría existir una etiología de causa ambiental proveniente de varias fuentes (79). Por ejemplo, se ha mostrado que el hecho de fumar está asociado con el desarrollo de la FPI, así en un estudio reciente de fibrosis pulmonar idiopática familiar, se demostró esta asociación en una cohorte de 309 individuos afectados (76) después de ajustar por sexo y edad(8). De igual forma, en un estudio de casos-control, llevado a cabo en una cohorte de Estados Unidos, que consistió de una población de 248 pacientes con FPI y 491 sujetos control, se

demonstró una asociación significativa entre el desarrollo de FPI y la exposición al tabaco y en la población dedicada a la ganadería (3).

Así mismo, se ha sugerido la existencia de una susceptibilidad genética al desarrollo de la fibrosis pulmonar, esto, en los casos de etiología conocida, donde la enfermedad se desarrolla solo en pequeños grupos de individuos, mientras que la mayoría de individuos tratados con el mismo agente agresor no desarrollan la enfermedad, sugiriendo un patrón genético que determina niveles de susceptibilidad y resistencia (5).

Por otra parte, en modelos experimentales de fibrosis pulmonar inducida con diferentes agentes (bleomicina, asbesto), se ha demostrado que existen cepas de ratones susceptibles y cepas resistentes al desarrollo de dicha enfermedad (30, 42, 85).

Otro dato que apoya la susceptibilidad genética, es que algunos estudios han revelado la presencia de la FPI familiar (48), donde se ha encontrado pacientes que desarrollan FPI en 3 o 4 generaciones sucesivas de una familia y por otra parte se han reportado gemelos idénticos que desarrollaron FPI (36).

Sin embargo, la mayoría de los pacientes presentan una forma esporádica de FPI (no familiar). En este campo se han desarrollado estudios de casos-control que han tratado de identificar polimorfismos genéticos asociados a esta enfermedad, y donde se ha encontrado asociaciones débiles o ausencia de relación. (33, 41, 62, 98, 99). Adicionalmente, hay estudios donde se muestra que un determinado SNP se asocia con el comportamiento clínico y con el desarrollo de FPI, como es el

caso de polimorfismos no sinónimos presentes en los codones 10 y 25 del gen de TGF- β 1, en los cuales no existe una diferencia entre el grupo de pacientes y los sujetos control, pero están asociados con una peor evolución clínica (91).

Por otro lado, existen reportes donde se han encontrado asociaciones de ciertos polimorfismos con el desarrollo de la FPI. Por ejemplo algunos polimorfismos localizados en los genes de las proteínas A y B del surfactante pulmonar, se encuentran con una mayor frecuencia en pacientes con FPI. De igual forma SNP's localizados en el promotor de IL-4 presentan una frecuencia mayor en pacientes fibróticos comparados con el grupo control. Recientemente, en un estudio del complejo principal de histocompatibilidad se encontró que ciertos haplotipos de este complejo confieren susceptibilidad al desarrollo de FPI además de estar relacionados con la inducción de células epiteliales de pulmón (26, 83). Sin embargo, no existe a la fecha ningún reporte de polimorfismos presentes en los genes de las metaloproteasas de matriz con el desarrollo de FPI.

Como se ha mencionado se desconocen los mecanismos patogénicos de la FPI y se ha propuesto que al menos hay dos rutas para el desarrollo de fibrosis pulmonar difusa. Una de éstas es la "ruta inflamatoria" donde hay una fase temprana y claramente distinguible de alveolitis seguida de una fase tardía de fibrosis, esta vía está representada por casi todas las enfermedades pulmonares intersticiales no asociadas a FPI (52, 78). Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo ha fundamentado que la FPI no representa la vía inflamatoria y se ha propuesto que existe una "vía epitelial" que se caracteriza por un daño inicial al

epitelio alveolar que es seguido de una descarga de mediadores pro inflamatorios y fibroproliferativos que por razones desconocidas no conducen a una reparación normal y el proceso de desarrollo de fibrosis continúa (67).

En este contexto se ha propuesto que la FPI es desde los estadios tempranos, una enfermedad epitelial/ fibroblástica, es decir, un desorden fibroproliferativo precedido por una activación celular (epitelio/alveolar) que induce la migración/proliferación de fibroblastos, siendo estos aparentemente los primeros sitios de la lesión y reparación, llamados “focos de fibroblastos”. Una vez que los fibroblastos han migrado y proliferado dentro del microambiente pulmonar dañado, adquieren el fenotipo de miofibroblastos que gradualmente cambian sus principales funciones de síntesis de proteínas específicas y contractibilidad.

Los mecanismos involucrados en la diferenciación de miofibroblastos, así como el origen de sus células progenitoras en pulmones fibróticos no son claros aún, sin embargo se cree que varias citocinas están implicadas. Por ejemplo, al TGF- β 1 se le ha relacionado en la patogénesis de la fibrosis, no sólo por su capacidad de acelerar la acumulación de moléculas de MEC, sino también por su capacidad de promover la diferenciación a miofibroblastos, sobre expresando alfa actina de musculo liso (α -SMA), ya sea *in vivo* o *in vitro* (21). Además de ser un marcador de diferenciación de miofibroblastos, la alfa-SMA es importante en el mecanismo de contracción celular, la cuál está probablemente involucrada en el decremento característico de la distensibilidad observada en pacientes con fibrosis pulmonar.

Uno de los papeles principales de los miofibroblastos en el proceso de cicatrización, debido a su fenotipo contráctil, es el de reducir el área de la superficie desnuda en el tejido dañado, acercando los márgenes de las microheridas.

Por otro lado, los miofibroblastos de pulmones con FPI inducen muerte celular del epitelio alveolar, y al menos en parte, la falta de re-epitelización adecuada parece ser provocada por este mecanismo (56, 80). Además, los miofibroblastos provocan la ruptura de la membrana basal, perpetuando el daño y evitando una re-epitelización apropiada. El resultado final es la acumulación excesiva de matriz extracelular con una destrucción de unidades capilares-alveolares y la formación de espacios fibróticos quísticos, lo cuál lleva a la destrucción de la arquitectura del parénquima pulmonar (68). **(Figura 1)**

Figura 1. Mecanismos generales de la FPI.

El proceso fibrótico se inicia con una activación epitelio/alveolar, la cual induce la migración/proliferación de fibroblastos, y a su vez ocurre una diferenciación a miofibroblastos. Estos últimos inducen muerte celular del epitelio alveolar, una acumulación excesiva de matriz extracelular, y una ruptura de la membrana basal, lo cuál tiene como resultado final una destrucción de la arquitectura del parénquima pulmonar.

METALOPROTEASAS DE MATRIZ Y SUSTRATOS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (MEC) es una estructura dinámica que no solo constituye un soporte estructural que determinan la histo-arquitectura específica para cada órgano si no que regula el comportamiento de las células que se encuentran en contacto con ella, afectando así su desarrollo, adhesión, migración, forma y funciones metabólicas. Las células se unen a la matriz extracelular a través de receptores de superficie de la familia de las integrinas, desencadenando señales de transducción que afectan diversas funciones celulares (2). Además, la MEC participa activamente en la presentación de una gran variedad de factores de crecimiento. En este contexto el recambio altamente controlado de la MEC es crítico para mantener la estructura y función de los órganos entre ellos la del pulmón (77).

El desequilibrio entre la síntesis y degradación de las moléculas de la MEC está bien documentado en diferentes condiciones patológicas como es el caso de la fibrosis y el enfisema pulmonar (55). La degradación de la MEC se realiza por enzimas proteolíticas que pueden actuar tanto a nivel de membrana como extracelularmente, y a estas enzimas se les conoce como metaloproteinasas de matriz (MMP's de su abreviatura en ingles *Matrix metalloproteinases*), estas, comprenden una gran familia de metaloenzimas que poseen características estructurales comunes.

Estas enzimas son una familia de endopeptidasas que contienen un sitio activo de Zn^{2+} (de allí del prefijo “metalo”), de las cuales se han reportado 23 de estas en el humano y 24 en mamíferos. Estas enzimas fueron descritas en un principio como procesadoras de la matriz extracelular (MEC) con un papel predominante en la homeostasis de ésta, sin embargo, ahora es claro que su función va más allá del solo hecho de degradar MEC. Recientemente, se ha descrito su papel en la regulación del crecimiento celular a través del procesamiento de factores de crecimiento y receptores que se encuentran unidos en la superficie celular; la liberación de factores de crecimiento que se encuentran secuestrados en la MEC o señalización de integrinas; regulación de apoptosis vía la liberación de factores de muerte o sobrevivencia; alteración de la motilidad celular; efectos en el sistema inmune; y modulación de la bioactividad de citocinas. (16)

Tradicionalmente las MMP's han sido clasificadas basándose en la especificidad por el sustrato, en características estructurales de los dominios, en su localización celular y en su estructura primaria (47, 89). Sin embargo nuevos descubrimientos de estas enzimas hacen difícil su clasificación y se han propuesto alternativas diferentes para su clasificación. (11)

Una MMP debe tener al menos dos dominios conservados, uno llamado prodominio y el dominio catalítico. El prodominio de una MMP típica es de cerca de 80 aminoácidos, y todas las MMP's, excepto MMP-21 y MMP-23, contienen la secuencia consenso PRCXXPD.

El dominio catalítico (de 170 aa aproximadamente) contiene un sitio activo de Zn^{2+} , que se une a tres histidinas conservadas en la secuencia HEXXHXXGXXHS/TXXXXXXM, la cual también contiene una metionina conservada al lado carboxilo del sitio de unión al zinc. En el estado inactivo, el residuo conservado cisteína en el prodominio provee el cuarto sitio de coordinación para el ión de zinc catalítico, y la ruptura de este puente es necesaria para la actividad enzimática (8, 89). **(Figura 2)**

Además de las dos regiones conservadas, las MMPs tienen una variedad de dominios especializados que contribuyen a la especificidad del sustrato y reconocimiento o interacción con otras proteínas o moléculas.

Las MMP's tienen una región de unión bisagra, la cual es rica en prolina, y un dominio carboxilo terminal llamado tipo hemopexina (de 120 aa aproximadamente). El dominio tipo hemopexina es requerido para la actividad de triple helicasa. Además se ha demostrado que el dominio hemopexina juega un papel funcional en la unión al sustrato y en interacciones con inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP's). (50, 71)

Dependiendo de sus características estructurales y funcionales las MMPs se han clasificado en 6 subgrupos diferentes de miembros cercanamente relacionados que poseen afinidad de sustrato que en ocasiones se sobre lapa, estos subgrupos son: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMPs tipo membrana (MT-MMPs), y otras MMPs **(Tabla 1)**.

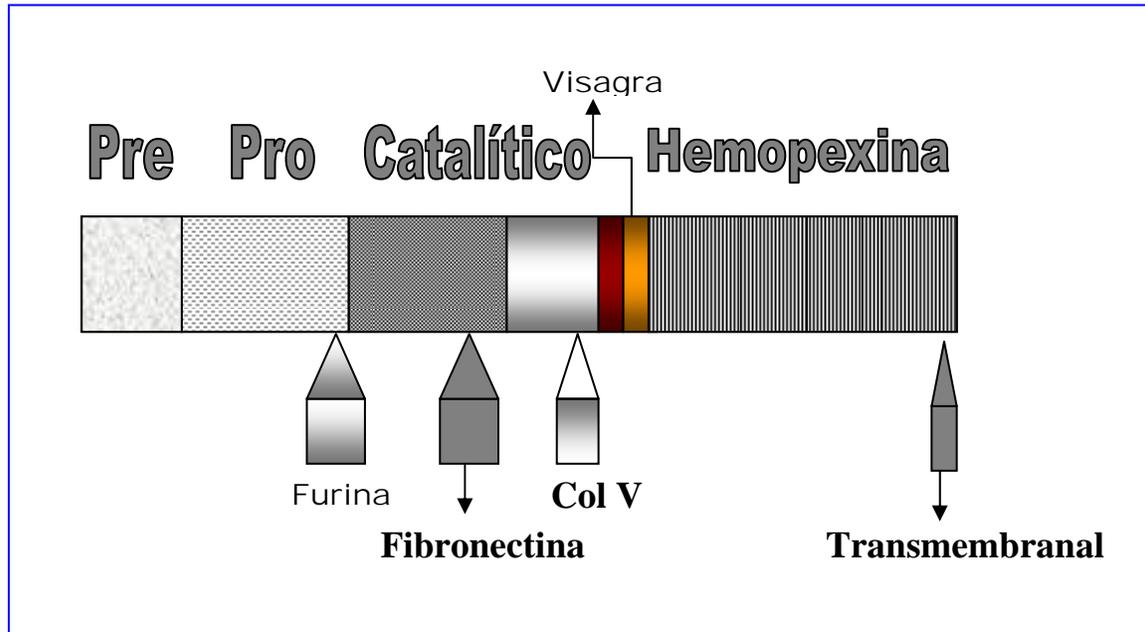


Figura 2. ESQUEMA DE DOMINIOS

Una MMP debe tener al menos dos dominios conservados, uno llamado prodominio y el dominio catalítico. El dominio catalítico contiene un sitio activo de Zn^{2+} . Además, las MMPs tienen una variedad de dominios especializados que contribuyen a la especificidad del sustrato y reconocimiento o interacción con otras proteínas o moléculas.

Tabla 1.

Clasificación de MMP's basada en sus características estructurales y funcionales.

| Subfamilia | MMP | Nombre común |
|---------------------|---------|------------------------------|
| Colagenasas | MMP-1 | Colagenasa -1 |
| | MMP-8 | Colagenasa -2 |
| | MMP-13 | Colagenasa -3 |
| | MMP-18* | Colagenasa -4 |
| Gelatinasas | MMP-2 | Gelatinasa A |
| | MMP-9 | Gelatinasa B |
| Matrilisinas | MMP-7 | Matrilisina 1 |
| | MMP-26 | Matrilisina 2. |
| Estromelisinias | MMP-3 | Estromelisina 1 |
| | MMP-10 | Estromelisina 2 |
| | MMP-11 | Estromelisina 3 |
| MMP's tipo membrana | MMP-14 | MT1-MMP |
| | MMP-15 | MT2-MMP |
| | MMP-16 | MT3-MMP |
| | MMP-17 | MT4-MMP |
| | MMP-24 | MT5-MMP |
| | MMP-25 | MT6-MMP |
| Otras | MMP-12 | Metaloelastasa de macrófagos |
| | MMP-19 | RASI-1 |
| | MMP-20 | Enamelisina |
| | MMP-21 | |
| | MMP-22 | CA-MMP |
| | MMP-23 | |
| | MMP-27 | Epilisina |
| | MMP-28 | |

***Colagenasa-4 fue aislada de Xenopus, y hasta el momento no se ha encontrado su homólogo en mamíferos.**

Colagenasas:

Esta subfamilia comprende 3 miembros: MMP-1 (colagenasa-1) la cual es expresada en su mayor parte por fibroblastos, macrófagos y células epiteliales; MMP-8 (colagenasa 2) que es expresada principalmente por neutrófilos; y MMP-13 (colagenasa 3) que es expresada por una gran variedad de células. Las colagenasas tienen como sustrato colágenas fibrilares tipos I, II y III.

- Las colágenas fibrilares son los componentes estructurales más abundantes de la matriz extracelular, y son moléculas homo o heterodiméricas, cuyas subunidades las cadenas α , son el producto de diferentes genes, estas cadenas varían en un tamaño que va de 600 a 3000 residuos de aminoácidos. Las cadenas α contienen uno o más segmentos de polipéptido con múltiples secuencias repetidas Gly-X-Y, donde cerca del 30% de las posiciones X e Y están ocupadas por prolina e hidroxiprolina respectivamente, estas secuencias, además de brindarle a la molécula estabilidad y rigidez hace posible que se formen triples hélices, es decir, una colágena fibrilar clásica en más de un 95% su estructura secundaria es de triple hélice (12, 81, 82). En el pulmón las colágenas de tipo I, II, y III constituyen el 95% de la colágena en este, las colágenas de tipo I y III se encuentran en el intersticio pulmonar, en las paredes de las vías aéreas y en los vasos sanguíneos, mientras que la colágena de tipo II se localiza en el cartílago bronquial (54). Un aspecto relevante de su metabolismo es que

estas moléculas son resistentes a la degradación de la mayoría de la proteasas.

Gelatinasas:

Esta subfamilia comprende 2 miembros la gelatinasa A o colagenasa tipo IV de 72 kDa (MMP-2) y la gelatinasa B de 92 kDa (MMP-9), estas enzimas degradan generalmente colágena tipo IV y elastina. Reciben el nombre de gelatinasas debido a su capacidad para degradar gelatina (colágena desnaturalizada) (89).

- La colágena tipo IV fue la primera colágena no fibrilar extensamente estudiada y es un componente de las membranas basales donde forma una fina red de cordeles entrelazados que atrapan a moléculas de gran tamaño como laminina o el proteoglicano heparán sulfato. Las cadenas de colágena tipo IV son estructuralmente similares y combinan un dominio largo en triple hélice con un dominio globular complejo en el extremo carboxilo terminal. , que es una estructura laminar con una porción en triple hélice y que se encuentra en membranas basales.
- La elastina es una proteína fuertemente hidrofóbica que se sintetiza en forma soluble (tropoelastina), se modifica post traduccionalmente, se empaca y se transporta a sitios específicos de la superficie celular donde se producen las uniones cruzadas y el ensamble final para la formación de las fibras elásticas. Las fibras elásticas desempeñan un papel fundamental en la estructura de las matrices intersticiales y en la organización tisular.

Dependiendo del tejido, por un lado otorgan la flexibilidad apropiada, y por otra, permiten la resistencia a los procesos de estiramiento. En este sentido, estas fibras se encuentran en cantidades significativas en aquellos tejidos en los cuales la extensibilidad reversible es importante en su función como ocurre con el pulmón, la piel y las grandes arterias.

Matrilisinas.

En esta subfamilia se reúnen la matrilisina (MMP-7) y la matrilisina-2 (MMP-26), estas han perdido el dominio carboxilo terminal, es decir, sólo contienen tres dominios necesarios para la secreción, latencia y actividad catalítica. Los sustratos de estas enzimas son muy amplios y variados y degrada entre otras moléculas de la matriz a la fibronectina (50, 89).

- Las fibronectinas constituyen una familia de glucoproteínas multifuncionales, que se pueden encontrar tanto en forma insoluble en la MEC, como en forma soluble circulando en el plasma. Las moléculas de fibronectina están formadas por 2 subunidades de 230 y 250 kDa respectivamente que se encuentran ligadas por uniones de disulfuro. La estructura de la fibronectina está fuertemente conservada en la escala evolutiva y es altamente repetitiva con 3 unidades básicas, denominadas homologías tipos I, II y III, las cuales constituyen el esqueleto de la proteína. Interviene estableciendo las conexiones que utilizan las células cuando

éstas migran a través de la matriz extracelular. Además es la principal proteína de unión entre las células y las fibras colágenas (75).

Estromelisin.

A esta subfamilia pertenecen las estromelisin 1 (MMP-3), 2 (MMP-10) y 3 (MMP-11), teniendo como sustratos principales a la fibronectina, laminina y colágena tipo IV (50, 89).

- La laminina es una glicoproteína filamentosa y es abundante en las láminas basales de las matrices extracelulares embrionarias. Tiene una estructura altamente conservada en diferentes especies como en el hombre, ratón, *drosophila*, sanguijuelas, y estrellas de mar. Consiste de tres cadenas polipeptídicas α (400kDa), B1 (220kDa) y B2 (205kDa) unidas por enlaces disulfuro para formar una estructura en forma de cruz con terminaciones globulares. Existen diversas formas de laminina y los cambios en la composición de subunidades de laminina pueden influir no solo en la interacción con los receptores celulares sino también en la interacción con otras moléculas de la matriz y por lo tanto en la arquitectura de la membrana basal. (2)

MMP's tipo membrana (MT-MMP).

A esta subfamilia la conforman 6 miembros diferentes MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP (MMP-17), MT5-MMP (MMP-24), MT6-MMP (MMP-25), son proteínas con un dominio de membrana y una cola citoplasmática, y un dominio de furina que sirve como sitio activo de reconocimiento para su activación intracelular. Estas enzimas tienen la capacidad de activar a otras MMP's como la MMP-2 y -13, además de degradar proteínas de la matriz extracelular (50, 89).

Otras MMP's.

En esta subfamilia se agrupan aquellas enzimas cuyas propiedades no les permite agruparse dentro de las subfamilias anteriores en este grupo encontramos a MMP-12 (metaloelastasa de macrófagos), MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-27, MMP-28 (50, 89).

REGULACIÓN DE LAS MMP's

La regulación en las MMP's ocurre tanto intra como extra celularmente y la actividad enzimática es el resultado final de una compleja serie de eventos que incluye la expresión del gen, la activación del zimógeno y la inhibición enzimática en el espacio extracelular.

Regulación transcripcional

La expresión génica de las MMPs es regulada por una variedad de citocinas, tales como factores de crecimiento y mediadores inflamatorios los cuales pueden incrementar o disminuir la síntesis de la enzima.

Algunas enzimas como MMP-2, MMP-19, MMP-28 y varias MT-MMPs, son expresadas en condiciones fisiológicas, participando en la homeostasis. Sin embargo la mayoría de las MMPs no son expresadas en estas condiciones, solo si son inducidas debido a un proceso de reparación o remodelación y en tejidos inflamados o dañados. En una gran mayoría, la producción de las MMPs es regulada a nivel de transcripción por señales específicas que son temporalmente limitadas y confinadas espacialmente (34). Citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la interleucina-1 (IL-1), son capaces de aumentar la expresión de las MMP's a través de una combinación de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales.

De este modo, se ha demostrado que los promotores de éstas, presentan diversos elementos *cis* que permiten que la regulación sea llevada a cabo por variados conjuntos de activadores *trans*, incluyendo AP-1, PEA3, Sp1, β -catenina/Tcf-4 y el NF- κ B. Muchos de los promotores de MMPs son muy semejantes y, de hecho, comparten algunos elementos *cis*, lo cuál es consistente con observaciones en donde algunas MMPs son co-reguladas en su expresión. En contraste, la composición de los promotores funcionalmente relacionados de las MMPs como son, MMP2 y MMP9 o MMP1 y MMP8 es distinta.

Con base en la composición de los elementos *cis*, los promotores de las MMPs pueden ser agrupados en tres grupos (**Figura 3**). El primer grupo, que comprende a la mayoría de los promotores de las MMP (MMP-1, -3, -7, -9, -10, -12, -13, -19 y -26), contiene una caja TATA aproximadamente a -30 p.b. (relativo al sitio de inicio de la transcripción) y un sitio de unión AP-1 aproximadamente a -70 p.b. Los promotores de las MMPs del segundo grupo (MMP-8, -11, y -21) también contienen una caja TATA, pero carecen de un sitio AP-1 proximal. La regulación de estos promotores es relativamente sencilla y distinta con respecto al primer grupo de promotores.

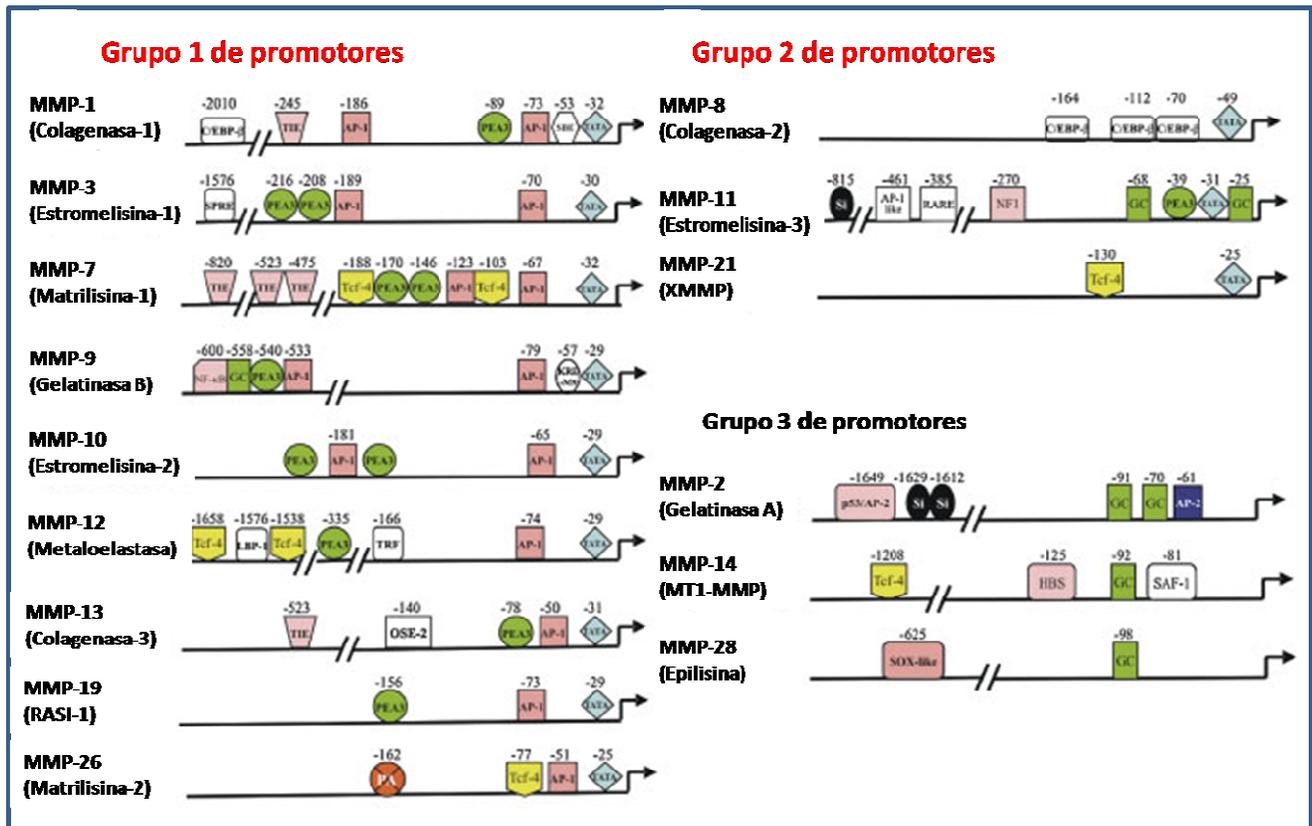


Figura 3. Grupo de promotores de MMPs.

Los promotores de las MMPs pueden ser agrupados en tres grupos con base en la composición de sus elementos cis.

El último grupo de promotores (incluyendo MMP2.-14 y -28) no poseen una caja TATA, de ahí que, la transcripción en éstos promotores comienza en múltiples sitios. Además la expresión de las MMPs en éste último grupo está determinada principalmente por la familia ubiquitinada de factores de transcripción Sp1, los cuáles se unen a una caja GC cercana. La mayor parte de la expresión de éstas MMPs es constitutiva, como en el caso del promotor de la MMP-2 humana, el cuál contiene ciertos elementos regulatorios *cis*, donde la expresión de esta enzima está sujeta, al parecer, a la regulación por factores de transcripción con una inducción en pequeña proporción por factores de crecimiento o citocinas.

La presencia de sitios de unión a AP-1 en la mayoría de los promotores de las MMPs responsabiliza a estos genes de los cambios en la actividad y/o cantidad de los activadores *trans* correspondientes, ya sea solos o en cooperación con PEA3. De hecho una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento, incluyendo interleucinas, interferones, EGF, KGF, NGF, HGF, bFGF, VEGF, PDGF, TNF- α y TGF- β activan la señalización celular culminando en la activación de factores *trans* de los promotores de las MMPs convergiendo en elementos AP-1 y/o PEA3 (28). El incremento en la expresión por este tipo de *trans*-activación a través de AP-1 o PEA3 es mediada por la fosforilación de proteínas cinasas dependientes de mitogenos (MAPKs) (20).

Factores de transcripción AP-1 y regulación de MMPs

Diversas vías de señalización mediadas por citocinas y factores de transcripción convergen en un sitio de unión AP-1, el cual también constituye el elemento responsivo a esteres de forbol (TRE “*phorbol ester-responsive element*”). El factor de transcripción AP-1 es un complejo de heterodímeros de proteínas de la familia de proto-oncogenes (*jun* y *fos*). Estos factores de transcripción son proteínas de cremallera de leucinas que se unen a secuencias consenso de ADN (5'- TGAG/CTCA-3') como complejos diméricos (38).

Los elementos AP-1 localizados en las posiciones -72 y -66 de los promotores de varias MMPs juegan un papel importante en la regulación transcripcional de estas enzimas, y esto ha sido demostrado mediante mutaciones que se han llevado a cabo en estos sitios, las cuales, reducen dramáticamente la actividad basal y la respuesta a estímulos externos (22, 86). Por otra parte, la función de sitios adicionales de unión a AP-1 encontrados en los promotores de MMP-1, -3 y -9 no está clara. Solo se ha demostrado que en el promotor de la MMP-1 de conejo, media los efectos de esteres de forbol. (4).

En otros estudios de co-transfección se ha demostrado que la sobre expresión de proteínas *fos* y *jun* aumenta la actividad del promotor de MMP-1. Sin embargo, la inducción simultánea del ARN mensajero de *c-jun* y *junB* precede la inducción de la expresión de MMP-1 por varios tipos de estímulo (84). *c-Jun* es capaz de estimular la actividad mínima del promotor de la MMP-1 como homodímero (*Jun/Jun*), mientras que la inducción mínima de este promotor por *jun-B* requiere la presencia de varios elementos AP-1 (19). De este modo se cree que *c-Jun* es un

activador independiente de la expresión de MMP-1, mientras que la *trans* activación del promotor de la MMP-1 por *jun-B*, y posiblemente otros factores de transcripción *AP-1*, es dependiente de la interacción con otros sitios de unión a factores de transcripción a adicionales elementos regulatorios *cis* del promotor de la MMP-1.

Factores de transcripción *ETS* y regulación de MMPs

Estos factores de transcripción se encuentran en casi todos los promotores inducibles de MMPs, con la excepción de MMP-12, y se encuentran localizados en sitios adyacentes de al menos un elemento *AP-1*. Este factor de transcripción se une a elementos conservados llamados PEA3 (del inglés "*polyoma enhancer A binding protein-3*"). Estos factores de transcripción son proteínas que contienen en su estructura primaria la secuencia hélice-asa-hélice que contiene un dominio modular caracterizado por un dominio *ETS* altamente conservado, el cual reconoce el elemento PEA3 rico en purina (A/CGGAA/T) (72). Aunque se demostró que las proteínas *ETS trans* activan constructos de promotores artificiales conteniendo solo el elemento *PEA3*, este factor no dimeriza usualmente ni se une al ADN solo, si no que forma complejos con otros factores de transcripción como *AP-1*, funcionando como coactivadores (15).

La interacción funcional entre los factores *AP-1* y *ETS* en la regulación transcripcional de MMPs revelan que las interacciones *in vivo* entre los distintos factores de transcripción pueden modular la respuesta de promotores de MMPs,

especialmente en situaciones donde la inducción simultánea de la expresión de ambos ocurre, como en el caso de invasión y crecimiento celular (87).

Activación e inhibición de MMPs

A nivel de activación, las MMPs se regulan a través de la digestión parcial del dominio propeptídico. En algunos casos, como en las procologenasas de fibroblastos, neutrófilos y las proestromelisininas 1 y 2, los propéptidos presentan zonas de rompimiento para enzimas como la plasmina y la tripsina; el rompimiento desestabiliza la interacción entre un residuo de Cis y el Zn^{2+} y la conformación de la proteína cambia, permitiendo así el proceso autocatalítico hacia la forma activa. Los activadores fisiológicos de muchas de estas enzimas no se conocen con precisión; sin embargo, se ha sugerido la existencia de una cascada en la que algunos de los miembros de la familia de las MMPs tienen la capacidad de activar a otros miembros de la misma familia. En el caso de la pro gelatinasa A (pro MMP-2), la activación se lleva a cabo en la superficie celular y las metaloproteinasas de membrana desempeñan un papel central mediante un complejo mecanismo que involucra a la MT1-MMP, y al TIMP-2 (9).

Finalmente a nivel de regulación por inhibición, los principales inhibidores fisiológicos de las MMP's son una familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), de los cuales se han descrito cuatro tipos diferentes llamados TIMP-1, 2, 3 y 4. Los TIMP's forman complejos de alta afinidad con las formas activas de MMP's e inhiben su actividad enzimática a través de una

interacción no covalente. Estos inhibidores tienen entre otras propiedades, las de ser moduladores de la proliferación, promotores del crecimiento celular, inhibidores de la angiogenesis, apoptosis, etc. (88). Por otra parte inhibidores generales de proteinasas como α 2-macroglobulinas, tienen también la capacidad de inhibir MMPs.

POLIMORFISMOS NUCLEÓTIDO SENCILLO (SNP)

Los polimorfismos son distinguidos terminológicamente de las mutaciones por un criterio de frecuencia. Las diferentes formas de los polimorfismos (llamados “alelos”) se encuentran mas frecuentes en las poblaciones con respecto a las mutaciones, esto es, en una frecuencia mayor al 1%.

Actualmente, más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN han sido catalogadas en el dbSNP (base de datos publica de SNP's) (73,74). Se ha descrito que los SNP's se presentan uno cada 200 pares de bases en el genoma humano. Basados en este dato se esperaría que existieran aproximadamente 9 millones de SNP's en el genoma humano, muchos de los cuales ya han sido descritos en el dbSNP (17).

Los SNP's pueden estar presentes en regiones codificantes y pueden provocar un cambio en un aminoácido, y a este tipo de SNP's les conoce como “no sinónimos”. Debido a que este tipo de SNP's pueden afectar directamente la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones (10).

Por otra parte existen variaciones funcionales que pueden causar alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta, y pueden estar localizados en la región promotora del gen influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones (modulando la estabilidad de la

proteína), en sitios de “splicing” (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones), o en regiones intragénicas (6, 44).

Otro tipo de SNP's son los llamados “sinónimos” (o silenciosos) los cuales no alteran la conformación del gen, sin embargo se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido (23).

De acuerdo a su localización en el genoma los SNP's son clasificados de la siguiente manera: iSNP si están localizados en regiones intrónicas, cSNP en regiones codificantes (exones), rSNP en regiones reguladoras y gSNP localizados en regiones intergenómicas. Los cSNP pueden estar representados por SNPs sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP) (14) (**Figura 4**).

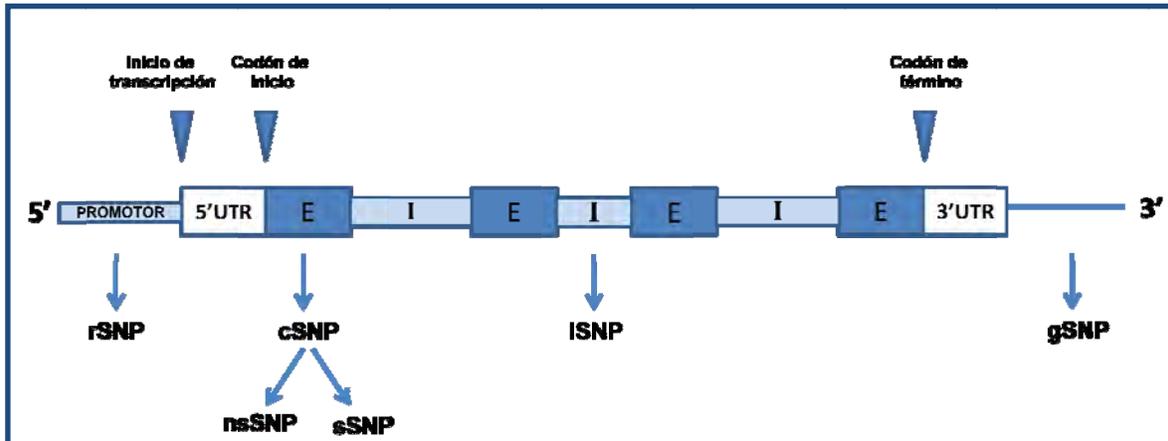


FIG.4: CLASIFICACION DE SNP's DE ACUERDO A SU LOCALIZACIÓN EN EL GENOMA.

iSNP localizados en regiones intrónicas; *cSNP* en regiones codificantes (exones), *rSNP* en regiones reguladoras y *gSNP* localizados en regiones intergenómicas. Los *cSNP* pueden estar representados por SNPs sinónimos (*sSNP*) o no sinónimos (*nsSNP*).

(E-Exones; I- Intrones; UTR- Regiones no codificantes)

Polimorfismos funcionales en los promotores de MMPs

Uno de los mejores ejemplos es el SNP localizado en la región promotora de MMP-1 en la posición -1607, el cual consiste en la adición de una guanina, la cual resulta en la creación de un sitio de unión para el factor de transcripción Ets-1(65). Se ha reportado que el alelo 2G del promotor de la MMP-1 en la posición -1607 aumenta la actividad transcripcional y una mayor producción de esta enzima (37, 65, 90), y se ha asociado con la susceptibilidad al desarrollo de diversos tipos de cáncer entre ellos, el cáncer de pulmón (25, 31, 97). Por otra parte, una inserción de una adenina en el promotor de la MMP-3 en la posición -1171 genera un alelo 6A (92), y se ha reportado, tiene una afinidad mayor por el factor de transcripción ZBP-89 comparada con el alelo 5A, y del cual, el alelo 6A se ha asociado con un bajo riesgo al desarrollo de cáncer pulmonar (27).

Del mismo modo se han reportado sustituciones de nucleótidos en las regiones promotoras de la MMP-2, -9, y 12. En el caso de la MMP-2 se han reportado dos polimorfismos funcionales, uno consiste en la sustitución de una citocina por una timina en la posición -1306, en la cual se ha demostrado que el alelo T rompe un sitio de unión Sp-1, reduciendo así la actividad transcripcional de la enzima (60). La asociación entre el polimorfismo -1306 C/T y la susceptibilidad a cáncer humano ha sido investigada en diversos estudios, demostrando que el alelo C está asociado a un incremento en el riesgo de cáncer común, incluyendo el de pulmón, de mama, gástrico, oral, y colorectal (93, 94, 95). Por otra parte, se ha descrito otra sustitución en la región promotora de esta enzima en la posición -1576, la cual consiste de una adenina por una guanina, la cual, interfiere con la unión del

receptor de estrógeno α al promotor y está asociado con una disminución de la actividad transcripcional (29). Por otro lado, en el promotor de la MMP-12 existe una sustitución de A por G, adyacente a un sitio AP-1, el cual reduce la afinidad por este factor de transcripción, afectando la respuesta a PMA e insulina (35). Finalmente en la región promotora de la MMP-9 se ha descrito la sustitución de una citocina por una timina en la posición -1562, la cual produce una actividad transcripcional más alta, sin embargo no se ha demostrado que factor de transcripción se une a dicho sitio (96).

MMP y FPI

Aunque los principales factores y los mecanismos involucrados en la remodelación de la FPI no se conocen con precisión, a la fecha, existen reportes que han demostrado que varias MMPs desempeñan un papel importante en la patogenia de esta enfermedad (58). Estudios de microarreglos han demostrado que MMP-1, -2, -7 y -28 se encuentran sobre expresadas en pacientes con diagnóstico de FPI comparado con sujetos control (69).

Recientemente se reportó que existen niveles proteicos altos de MMP-1 y MMP-7 en circulación, sugiriendo que estas enzimas podrían servir como bio marcadores moleculares para el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática, ya que ambas MMPs se distinguen claramente de los pacientes con este desorden comparados con sujetos normales u otras enfermedades crónicas del pulmón (63). De manera interesante, se ha demostrado que un ratón carente de MMP-7 es resistente al desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, sugiriendo que esta

enzima es crítica en el desarrollo de esta enfermedad (100). El papel de ésta enzima en la fibrosis pulmonar podría ser múltiple considerando su amplia especificidad por sustrato. Diferentes estudios han sugerido que participa en procesos fisiológicos durante la apoptosis, inflamación e inmunidad nata, entre otros (49). De igual forma se ha propuesto que participa en el corte del ectodominio de E-caderina en el epitelio de pulmones dañados con bleomicina, siendo un factor crítico de la reparación epitelial (43).

Como se mencionó anteriormente, se ha encontrado que la expresión del gen de la MMP2 se encuentra sobre expresada en tejidos de FPI y su forma activa esta generalmente incrementada en los fluidos de lavados bronquiolo-alveolares (LBA). Además, la MMP2 se encuentra generalmente sobre regulada en modelos experimentales de fibrosis pulmonar y ésta sobre expresión, así como el caso de la MMP9, se sospecha, está implicada en la ruptura de la membrana basal. Esta ruptura de la membrana basal, puede contribuir al fallo de la reparación ordenada de las células epiteliales tipo I alveolares dañadas, afectando, la re epitelialización normal y sobre todo esta puede tener un papel deletéreo adicional por la inducción de apoptosis epitelial. De hecho, la integridad de la membrana basal es necesaria para suprimir la muerte celular programada como ha sido demostrado en epitelio de mamíferos y otros tejidos (7, 13).

Por otro lado se supondría que las colagenasas estarían menos expresadas en la enfermedad por la evidencia de la acumulación excesiva de colagenas fibrilares (tipo I y III). Sin embargo, se ha demostrado que, la MMP-1 está altamente

incrementada en pacientes con FPI, y que la proteína se localiza en células epiteliales alveolares mientras que se encuentra prácticamente ausente del espacio intersticial, donde la colágena esta siendo acumulada, sugiriendo que el papel de la MMP-1 en el desarrollo de la FPI va mas allá del hecho de degradar colágena fibrilar. Recientemente se ha demostrado que la MMP-1 tiene la capacidad de regular actividades migratorias a través de la unión de β 1 integrinas sobre la membrana plasmática de monocitos y queratinocitos humanos (18, 24). Por otro lado se ha demostrado la presencia de esta proteína en el espacio intracelular, siendo acumulada durante la fase mitótica del ciclo celular, por lo cual se ha propuesto que esta enzima podría tener una participación durante el crecimiento celular (45).

Dados los antecedentes anteriores consideramos que uno de los factores que contribuyen al incremento de la MMP-1 en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática son variantes genéticas que influyen en su actividad transcripcional. Por lo que el objetivo del presente estudio es identificar si existe una asociación de estas variantes (localizadas en la posición -1607 y -755) con el desarrollo de la FPI.

METODOLOGÍA

Población de estudio

Se estudiaron 130 sujetos mestizos mexicanos no relacionados (67 hombres y 63 mujeres, 62.5 ± 9.6 años) con diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática, el cual fue sustentado por estudios de función pulmonar, inspección física, historia y estudio de lavados bronquio alveolares, (1). En 40% del diagnóstico de pacientes con FPI fue confirmado por morfología (biopsias de pulmón) basado en examinación microscópica de neumonías intersticiales (39). En la ausencia de biopsias, los pacientes tuvieron que cumplir con los criterios del consenso internacional del ATS. Los pacientes incluidos en el grupo fueron informados de su participación en el estudio, firmando una carta de consentimiento, y el protocolo fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

En cuanto a los criterios de inclusión se tomó en cuenta que los sujetos fueran mexicanos por abolengo, es decir, que el individuo tuviera al menos tres generaciones de residencia en el país. Mientras que el principal criterio de exclusión fueron pacientes con causas de enfermedades pulmonares intersticiales de causas conocidas (B.G. enfermedades vasculares, toxicidad debido a drogas y exposición al medio ambiente). Los datos clínicos incluyendo el hábito de fumar fueron obtenidos de sus registros clínicos. Los diferentes hábitos fueron caracterizados como “no fumadores”, “fumadores antiguos” (pacientes quienes dejaron de fumar al menos 12 meses antes del diagnóstico de la enfermedad), o

“fumadores actuales” (pacientes que a la fecha fuman o dejaron de fumar en hace menos de 12 meses del diagnóstico) (70).

Como grupo control se analizaron 305 individuos mestizos mexicanos (189 hombres, 116 mujeres, 40 ± 12.4 años) no relacionados entre si, ni con los pacientes con diagnóstico de FPI. Del grupo de estudio, 49 pacientes con FPI y 107 sujetos control fueron antiguos fumadores o actuales fumadores.

Determinación de genotipos

Extracción de ADN

Para la determinación de genotipos se realizó la extracción ADN genómico, esto, a partir de 10 ml de sangre periférica usando el estuche comercial de extracción *BD tract isolation kit* (Maxim Biotech, San Francisco CA, USA). El ADN fue cuantificado por espectrofotometría de absorción a 260 nm de longitud de onda.

Los polimorfismos fueron determinados por la técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). Para cada polimorfismo, un fragmento del sitio polimórfico fue amplificado por PCR usando oligonucleótidos específicos.

Para determinar el SNP localizado a -1607 p.b. del promotor de la MMP-1 se amplificó un fragmento de 269 p.b. utilizando los siguientes oligos:

sentido: 5'- TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA- 3';

antisentido: 5'-TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAGC-3'.

El oligo antisentido fue diseñado de tal forma que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Alu I* (AGCT), esto, reemplazando una T por una G en la segunda posición cercana al sitio 3' del oligonucleótido.

De esta forma el alelo 1G tiene el sitio de restricción para la enzima *Alu I*, mientras que el alelo 2G rompe este sitio debido a la inserción de la guanina.

Por otra parte, para el SNP localizado a -755 p.b. (G > T) del promotor de la MMP-1 se amplificó un fragmento de 120 p.b. utilizando el siguiente juego de oligonucleótidos:

sentido: 5'- GATCCTCCCACCTCAGCCTCTTCG- 3'

antisentido: 5'- CATGGTGAGACCCCATCTCT- 3'

En este caso el oligonucleótidos sentido se diseño de tal forma que se crea un sitio de restricción para la enzima *Msp I* (CCGG); esto se hizo reemplazando una A por una C en la segunda posición cercano al sitio 3' del oligonucleótido.

En este caso el alelo G contiene el sitio de restricción para dicha enzima, mientras que alelo T rompe este sitio de restricción.

La mezcla de reacción de la PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 20 ng de ADN genómico, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de cada oligonucleótido y 2.5 Unidades de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, CA).

Las condiciones del ciclaje fueron 2 min a 94°C seguido de 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg at 64°C, and 30 seg a 72°C, y con un paso final de extensión de 72°C por 7 min, esto fue llevado a cabo en un termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, CA).

Una alícuota del producto de PCR fueron digeridos con su respectiva enzima de restricción. Las endonucleasas usadas fueron *Alu* I (para -1607 G>GG), y *Msp* I (para -755 G>T). Una alícuota de 15 μ l del producto de PCR fue digerida toda la noche en un volumen final de 20 μ l, a 37°C en una reacción de 20- μ l conteniendo 10 unidades de la enzima de restricción (New England BioLabs, Beverly, MA) y 2 μ l de buffer. Posterior a la digestión, los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio.

Posterior a la electroforesis, los genotipos para el SNP localizado a -1607 p.b., fueron visualizados de la siguiente manera: el homocigoto 2G/2G fueron representados por el fragmento integro de 269 pb, mientras que el homocigoto 1G/1G estuvo representado por dos fragmentos de 241 y 28 pb, y el heterocigoto mostró la combinación de ambos alelos (269, 241 y 28 pb). (**Figura 5, A**)

Para el SNP localizado a -755 pb, el homocigoto T/T estuvieron representados por el fragmento integro de 120 pb, por otro lado el homocigoto G/G mostro 2 fragmentos producto de la digestión, uno de 97 pb y otro de 23, mientras que el heterocigoto muestra la combinación de los dos alelos (120, 97 y 23 pb).(**Figura 5, B**)

Para la validación del método, 20 muestras de productos purificados del gel de agarosa (Qiagen PCR purification kit) fueron secuenciados (Prism 3130x1 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, CA) y los datos fueron concordantes.

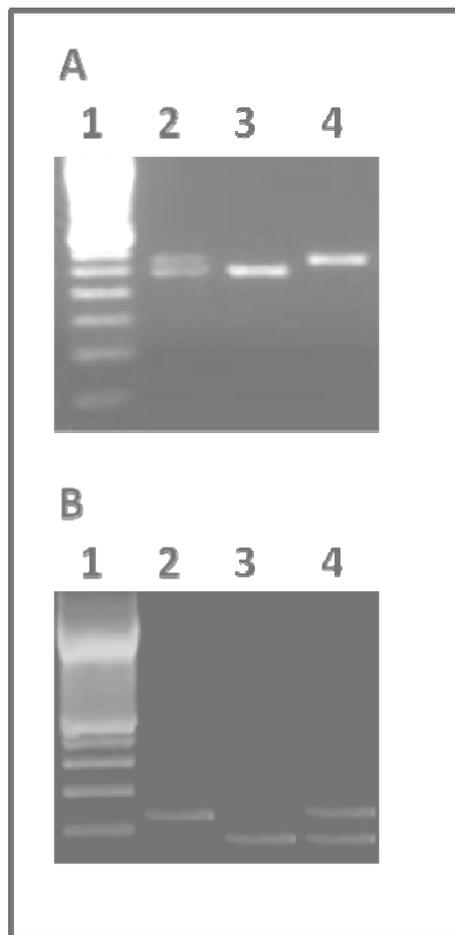


Figura 5. A: Representación de genotipos para el SNP localizado a -1607 p.b;
B: genotipos para el SNP localizado a -755 p.b.

Secuenciación de ADN

En busca de otros posibles SNPs funcionales localizados en la región promotora del gen de MMP-1, se secuenció ésta región en una mezcla de 10 sujetos mexicanos, utilizando el estuche comercial “*BigDye Terminator, v. 3.1, sequence kit*”, la reacción fue analizada en un secuenciador *ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, CA). Las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio del programa Chromas.

Posterior a la secuenciación del promotor de la MMP-1 se encontró una sustitución de guanina por timina, y utilizando un programa que predice posibles sitios de unión a factores de transcripción (“TRANSFAC” *Transcription Factor Database*, <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), se encontró en el alelo T, un posible sitio de unión para el factor de transcripción AP-1 en la región -755 p.b. del promotor de la MMP-1.

Cultivo celular

Se utilizaron fibroblastos de pulmón derivados de tejido pulmonar de pacientes con FPI y obtenidos de biopsias de pulmón. Los fibroblastos fueron aislados por dispersión con tripsina, y las células fueron cultivadas a 37°C en 5% de CO₂ a 95% de aire, esto, en medio F-12 de Ham (GIBCO BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; GIBCO BRL) y 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, and 2.5 mg/ml de amfotericinaB. Ocho líneas celulares fueron utilizadas para explorar la presencia de los genotipos usados en la región promotora de la MMP-1.

Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

La Inmunoprecipitación de Cromatina fue llevada a cabo de acuerdo a las instrucciones del protocolo (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). 1.5×10^7 de fibroblastos fueron crecidos en cajas de 100 mm. Para fijar las interacciones ADN-proteína se utilizó formaldehído a una concentración final de 1% a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS frío conteniendo inhibidores de proteasas (1mM de PMSF, 1 μ g/ml aprotinina y 1 μ g/ml pepstatina A) y se centrifugaron obteniendo un botón el cual fue utilizado para la lisis celular utilizando buffer SDS de lisis (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris, pH 8.1, con inhibidores de proteasas mencionado anteriormente). Después de incubar 10 min en hielo las células fueron sonicadas con el fin de fragmentar el ADN en fragmentos de 200 a 1000 pb. Posteriormente las muestras fueron inmunoprecipitadas toda la noche con 10 μ l de un anticuerpo monoclonal anti *c-Jun* (Cell Signaling Technology) en una dilución 1:250.

Posterior a la inmunoprecipitación (utilizando proteína G) se realizó el análisis por PCR del ADN inmunoprecipitado, usando 5ng del ADN. Para esto se utilizaron oligonucleótidos específicos que flanquean la región polimórfica (-825pb a -631pb del promotor de la MMP-1). El producto esperado fue de 195 pb y la mezcla de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 5 ng de ADN genómico, 1.5mM MgCl₂, 1X Taq ADN polimerasa buffer, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de cada oligonucleótido y 2.5 Unidades de Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, CA).

Las condiciones de la PCR fueron 2 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, y 30 s a 72°C, con un paso final de 72°C por 7 min. El ciclaje fue llevado a cabo en un *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, CA). Los productos de PCR fueron corridos por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio.

PCR en tiempo real

El ARN que se utilizó para la cuantificación génica fue extraído de fibroblastos pulmonares usando el reactivo de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) y posteriormente, a partir de 1µg de ARN se creó ADN complementario (cADN) mediante la técnica de transcripción reversa (Advantage RT-for-PCR Kit; Clontech, Palo Alto, CA) de acuerdo a las instrucciones del manual.

Para la amplificación por PCR en tiempo real se utilizó el equipo *i-Cycler iQ Detection System* (BioRad, Hercules, California, United States), usando ensayos de sonda TAQMAN específicos para el gen de la MMP-1 (PE Applied Biosystems, Wellesley, California, United States) marcada con FAM (Hs00899660_g1) y como gen endógeno se utilizó el 18S Ribosomal (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control). La PCR fue llevada a cabo utilizando el cADN, esto, en una mezcla de 25-µl, la cual contenía 3 µl of cADN, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.2µM de cada sonda TAQMAN (18S rARN y MMP-1), y 2.5 U de Taq Polimerasa Recombinante (Invitrogen, CA). Para la cuantificación se crearon curvas de número de copias seriales, las cuales abarcaban un rango de 1×10^8 a 1×10^1 . Los resultados fueron expresados como el número de copias del gen ajustado al número de

copias del gen endógeno (18S rARN). Las condiciones de la PCR fueron 2 min a 94°C seguido de 40 ciclos de 15 s a 94°C y 1 m a 60°C.

Análisis estadístico

Los datos de cuantificación génica están representados en promedio con desviación estándar. Para la comparación de frecuencias génicas entre grupos se determinaron sus frecuencias génicas, alélicas y haplotípicas. La significancia estadística se estableció utilizando el paquete estadístico Epi Info version 6.04b (Epi Info v6.04b; Stone Mountain, GA), tomando el valor de chi cuadrada (χ^2) con corrección de Yates. Con el fin de conocer la fuerza de asociación se estimó la razón de momios (OR) con intervalos de confianza del 95%.

RESULTADOS

Frecuencia génica y alélica del SNP -1607 del promotor de la MMP-1

El estudio de casos-control incluyó 130 pacientes con diagnóstico de FPI y 305 sujetos control. La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas para este polimorfismo se muestran en la Tabla 1. El genotipo 2G/2G presentó una frecuencia significativamente más alta en pacientes con FPI comparado con los sujetos control (63% vs 49%; $P < 0.008$). Esto nos indica que los sujetos portadores del genotipo 2G/2G presentan un riesgo mayor al desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática (OR=1.7; IC 1.15 – 2.79). En cuanto al análisis de las frecuencias alélicas, se encontró un significativo incremento en la frecuencia del alelo 2G en el grupo de pacientes comparada con el grupo control ($P < 0.006$; OR=1.6, IC 1.13 – 2.29), mientras que la frecuencia del alelo 1G fue considerablemente más baja en pacientes con FPI ($P < 0.006$; OR=0.62, IC 0.44 – 0.88).

Tabla 1. Frecuencias génicas y alélicas del SNP -1607 en casos y controles

| MMP1 genotipo | Pacientes FPI n=130 | | Controles n=305 | | pC | OR | IC (95%) |
|----------------------|------------------------|---------|--------------------|---------|--------------|-------------|--------------------|
| | No. | (Frec.) | No. | (Frec.) | | | |
| -1607 1G / 2G | | | | | | | |
| 1G / 1G | 10 | (0.08) | 36 | (0.12) | 0.23 | | |
| 1G / 2G | 38 | (0.29) | 119 | (0.39) | 0.10 | | |
| 2G / 2G | 82 | (0.63) | 150 | (0.49) | 0.008 | 1.79 | 1.15 – 2.79 |
| Alelos | | | | | | | |
| 1G | 58 | (0.22) | 191 | (0.32) | 0.006 | 1.61 | 1.13 – 2.29 |
| 2G | 202 | (0.78) | 419 | (0.68) | | | |
| -755 G / T | | | | | | | |
| G / G | 50 | (0.38) | 98 | (0.32) | 0.31 | | |
| G / T | 48 | (0.37) | 140 | (0.46) | 0.10 | | |
| T / T | 32 | (0.25) | 67 | (0.22) | 0.51 | | |
| Alelos | | | | | | | |
| G | 58 | (0.69) | 191 | (0.32) | 0.82 | | |
| T | 202 | (0.31) | 419 | (0.68) | | | |

Caracterización y análisis del SNP en la posición -755 de la región promotora de la MMP-1

Con el fin de encontrar nuevos polimorfismos funcionales en la región promotora de MMP-1, se llevó a cabo la secuenciación de una región correspondiente al promotor de dicha enzima en sujetos mexicanos. De forma interesante, se encontró un SNP localizado a -755 p.b. relativos al inicio de la transcripción, el cual consiste en la sustitución de una guanina por una timina (**Figura 6**). Esta sustitución se estudió en un programa gratuito llamado TRANSFAC (Transcription Factor Database), el cual predice posibles sitios de unión a factores de transcripción, y de forma interesante, se encontró que en la secuencia que contiene el alelo T existe un posible sitio de unión al factor de transcripción AP-1, mientras que en la secuencia que contiene el alelo G no existía dicha asociación (**Figura 7**).

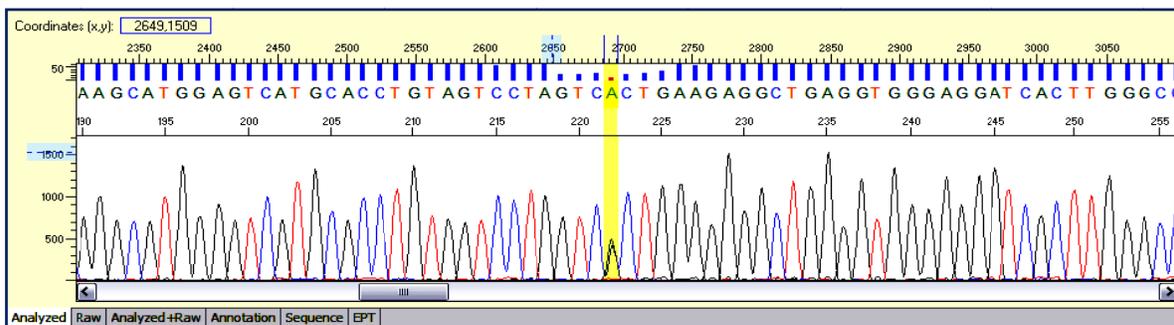


Figura 6. Secuenciación del promotor de MMP-1. El sitio polimórfico de la posición -755 (G/T) se muestra en la línea amarilla.

A

```
Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998
Query: ALLELE "G" (40 bases)
Taxonomy: Vertebrate
Threshold: 85.0 point

TFMATRIX entries with High-scoring:

1 CCACCTCAGC CTCTTCAGGG ACTAGGACTA CAGGTGCATG      entry      score
   <-----                ^                          M00271 AML-1a 88.7
                                     <-----          M00073 deltaE 88.2

Total 2 high-scoring sites found.
Max score: 88.7 point, Min score: 88.2 point
```

B

```
Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998
Query: ALLELE "T" (40 bases)
Taxonomy: Vertebrate
Threshold: 85.0 point

TFMATRIX entries with High-scoring:

1 CCACCTCAGC CTCTTCAGTG ACTAGGACTA CAGGTGCATG      entry      score
   <-----                ^----->                M00173 AP-1 89.7
                                     ^                          M00271 AML-1a 88.7
                                     <-----          M00073 deltaE 88.2

Total 3 high-scoring sites found.
Max score: 89.7 point, Min score: 88.2 point
```

Figura 7. Análisis de posibles sitios de unión a factores de transcripción en la región -755 del promotor de MMP-1 usando el software TRANSFAC.

A) Secuencia que contiene el alelo G.

B) Secuencia con el alelo T; donde se muestra un posible sitio de unión al factor de transcripción AP-1 (La flecha roja marca el nucleótido polimórfico).

Para corroborar la posible unión del factor de transcripción en la posición -755 se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP “*Chromatin Immunoprecipitation*”) usando fibroblastos de pulmón provenientes de pacientes con FPI, los cuales contienen los genotipos GG, GT y TT. Después de fijar las interacciones ADN-Proteína, se inmunoprecipitó con un anticuerpo contra AP-1 (*C-Jun*). Posteriormente el ADN precipitado se utilizó para hacer una PCR con oligonucleótidos específicos que flanquean la región promotora de la MMP-1 que contiene el sitio polimórfico, abarcando de la posición -825 a -631 p.b. Dicha amplificación reveló una interacción del factor de transcripción AP-1 en fibroblastos pulmonares que contienen el genotipo T/T y G/T en la región -755 del promotor de la MMP-1 (**Figura 8**), mientras que en fibroblastos que contienen el genotipo G/G no existe dicha interacción. En el control negativo (PCR sin anticuerpo) no se detectó amplificación. Solamente la muestra de cromatina total (*input*) presenta una amplificación (control positivo), confirmando que el factor de transcripción se une de manera específica al promotor cuando está presente el alelo T.

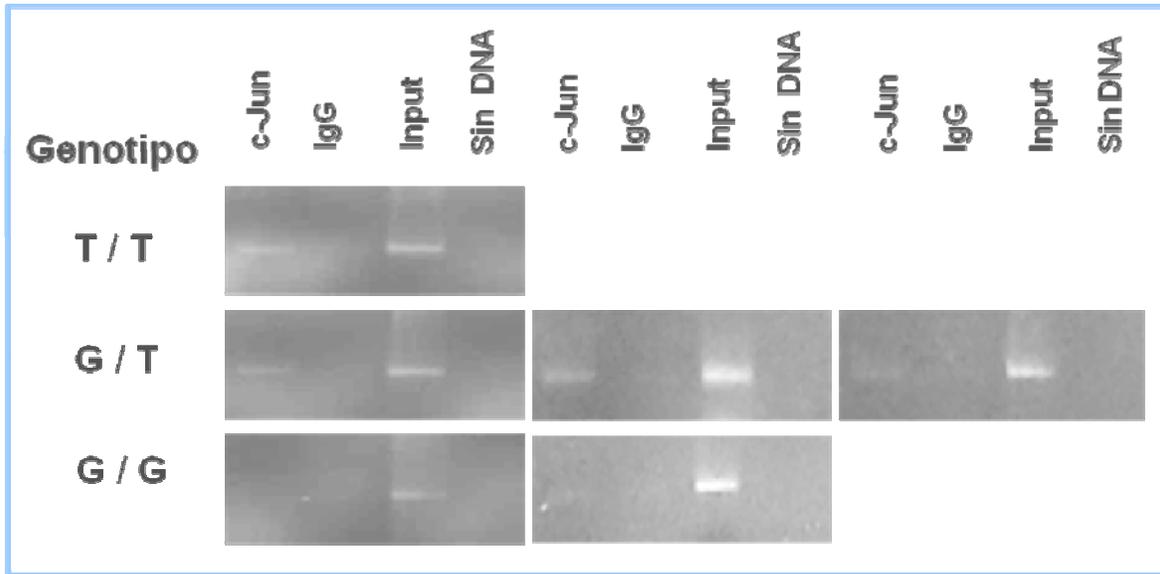


Figura 8: Análisis de la unión de AP-1 en la posición -755 del promotor de MMP-1.

El análisis se llevo a cabo por inmunoprecipitación de cromatina. La cromatina fue extraída de líneas primarias de fibroblastos pulmonares provenientes de pacientes con FPI, con diferentes genotipos: TT, GT (4 cultivos diferentes), y GG (2 cultivos diferentes). Se utilizó un anticuerpo anti c-Jun, el cual precipitó fragmentos que contienen el alelo T, pero no precipitó fragmentos del genotipo G/G. Como control positivo se utilizó cromatina total sin inmunoprecipitar (input). Los controles negativos son muestras sin anticuerpo (IgG).

Frecuencia génica y alélica del SNP -755 del promotor de la MMP-1

Cuando se analizaron las frecuencias del polimorfismo localizado en la región -755 en los 130 sujetos control y de los 305 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, no se encontraron diferencias entre los dos grupos. Sin embargo cuando la población se estratificó en sujetos fumadores y no fumadores (**Tabla 2**), se encontró un incremento de la frecuencia del genotipo T/T en pacientes fibróticos fumadores comparados con sujetos control fumadores (45 % vs 26%; P=0.03; OR=2.3; IC 1.01-2.74)

Tabla 2. Frecuencias génicas y alélicas del SNP -755 en casos y controles fumadores

| FUMADORES | Pacientes FPI n=49 | | Controles n=107 | | pC | OR | IC (95%) |
|-------------------|-----------------------|---------|--------------------|---------|-------------|-------------|--------------------|
| | No. | (Frec.) | No. | (Frec.) | | | |
| -755 G / T | | | | | | | |
| G / G | 12 | (0.25) | 32 | (0.29) | 0.61 | | |
| G / T | 15 | (0.30) | 47 | (0.44) | 0.16 | | |
| T / T | 22 | (0.45) | 28 | (0.26) | 0.03 | 2.30 | 1.15 – 4.97 |
| Alelos | | | | | | | |
| G | 39 | (0.42) | 111 | (0.52) | 0.04 | 0.60 | 0.37 – 0.95 |
| T | 59 | (0.68) | 103 | (0.48) | 0.04 | 1.68 | 1.01 – 2.74 |

Análisis de haplotipos de los SNP -1607 y -755

El análisis de los haplotipos de los dos sitios polimórficos localizados a -1607 y -755 pb relativos al inicio de la transcripción, mostraron un leve, pero significativo aumento en la frecuencia del haplotipo 1G/1G⁻¹⁶⁰⁷ – G/T⁻⁷⁵⁵, esto, en el grupo control [($P=0.05$, OR=0.14; IC 0.01 – 0.96) (**Tabla 3**)]. Después de hacer el ajuste por la condición de fumar, se encontró que el haplotipo 2G⁻¹⁶⁰⁷ – T⁻⁷⁵⁵, se encuentra en una frecuencia mayor en pacientes fibróticos fumadores, comparado con sujetos control fumadores (33 vs 24%, $P=0.04$: OR =1.6; IC 1.12 – 3.4) (**Tabla 4**). Por otra parte, en el grupo no fumador la frecuencia del mismo haplotipo (2G⁻¹⁶⁰⁷ – T⁻⁷⁵⁵) es mas baja en fibróticos (0.24) comparada con el grupo control (0.37) ($P=0.0009$: OR =0.57; IC 0.41 – 0.80). Otro hallazgo, en este mismo grupo, fue una mayor frecuencia del haplotipo 2G⁻¹⁶⁰⁷ – G⁻⁷⁵⁵ en pacientes fibróticos no fumadores.

Cabe señalar que no se encontraron desviaciones significantes del equilibrio de Hardy-Weinberg en la distribución de los diferentes genotipos del promotor de la MMP-1 del grupo control ni en los pacientes fibróticos. ($P<0.05$).

Tabla 3. Haplotipos individuales del promotor de MMP-1 en casos y controles.

| MMP1 -1607/-755 Haplotipo | Pacientes FPI n=130 | | Controles n=305 | | pC | OR | IC (95%) |
|---------------------------------|------------------------|---------|--------------------|---------|-------------|-------------|--------------------|
| | No. | (Freq.) | No. | (Freq.) | | | |
| 1G 1G / G G | 3 | (0.025) | 2 | (0.005) | NS | | |
| 1G 2G / G G | 6 | (0.05) | 16 | (0.052) | NS | | |
| 2G 2G / G G | 41 | (0.316) | 64 | (0.210) | NS | | |
| 1G 1G / G T | 1 | (0.008) | 18 | (0.058) | 0.05 | 0.14 | 0.01 – 0.96 |
| 1G 2G / G T | 20 | (0.158) | 55 | (0.181) | NS | | |
| 2G 2G / G T | 27 | (0.208) | 76 | (0.251) | NS | | |
| 1G 1G / T T | 8 | (0.058) | 17 | (0.058) | NS | | |
| 1G 2G / T T | 14 | (0.108) | 39 | (0.128) | NS | | |
| 2G 2G / T T | 10 | (0.075) | 18 | (0.058) | NS | | |

Tabla 4. Riesgo de haplotipos del promotor de MMP1 en fumadores

| MMP1 -1607/-755 Haplotipos | Pacientes FPI n=130 | Controles n=305 | pC | OR | IC (95%) |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------|---------------|-------------|--------------------|
| | (Freq.) | (Freq.) | | | |
| FUMADORES | | | | | |
| 1G / G | (0.10) | (0.14) | 0.09 | | |
| 2G / G | (0.32) | (0.35) | 0.48 | | |
| 1G / T | (0.25) | (0.27) | 0.64 | | |
| 2G / T | (0.33) | (0.24) | 0.04 | 1.60 | 1.12 – 3.40 |
| NO FUMADORES | | | | | |
| 1G / G | (0.11) | (0.09) | 0.60 | | |
| 2G / G | (0.54) | (0.39) | 0.004 | 1.87 | 1.38 – 2.54 |
| 1G / T | (0.11) | (0.15) | 0.055 | | |
| 2G / T | (0.24) | (0.37) | 0.0009 | 0.57 | 0.41 – 0.80 |

Expresión génica de MMP-1

Para cuantificar la expresión génica de la MMP-1 se llevó a cabo la tipificación del promotor de esta enzima en diferentes líneas celulares de fibroblastos provenientes de pacientes con FPI. De éstas, solo se encontró una línea con el genotipo 1G/1G de la posición -1607. Después se tipificó cada una de las líneas, se cuantificó la expresión génica de la MMP-1 en fibroblastos con diferentes genotipos del promotor de la MMP-1. De forma interesante se encontró que en la línea que contiene el genotipo 1G/1G tiene una expresión génica mas baja comparada con otras tres líneas que contienen el genotipo 2G/2G. Otro hallazgo relevante fue la presencia del alelo T de la posición -755 está asociado con un incremento de la expresión de la MMP-1. (Figura 9).

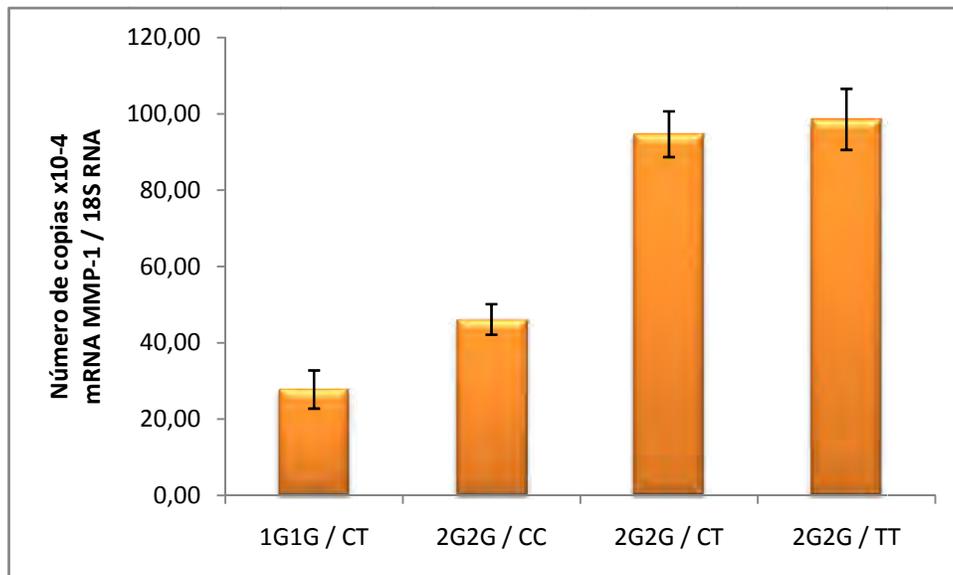


Figura 9: La expresión del ARN mensajero de la MMP-1 mRNA fue analizada por PCR en tiempo real y el gen del 18S rARNA fue usado como gen endógeno. El ARN mensajero de MMP-1 esta sobre expresado en células que contienen el alelo 2G (-1607) y el alelo T (-755).

Discusión

La fibrosis pulmonar idiopática pertenece a las enfermedades intersticiales del pulmón, ésta, es crónica, progresiva y letal, caracterizada por daño y activación de las células epiteliales, formación de focos de fibroblastos y una remodelación tisular anormal. Aunque los principales factores y los mecanismos involucrados en su remodelación no han sido esclarecidos aún, trabajos recientes han demostrado que varias MMPs, incluyendo la MMP-1, están altamente sobre expresadas en pulmones de pacientes fibróticos comparados con pulmones normales u otras enfermedades intersticiales de pulmón. (58, 59, 69, 103). Por otra parte, recientemente se reportó que existen niveles proteicos altos de MMP-1 y MMP-7 en circulación, sugiriendo que estas enzimas podrían servir como biomarcadores moleculares para el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática, ya que ambas MMPs se distinguen claramente de los pacientes con este desorden comparados con sujetos normales u otras enfermedades crónicas del pulmón (63).

En el presente trabajo, se llevo a cabo un estudio de asociación de casos/control para investigar la hipótesis de que polimorfismos funcionales del promotor de la MMP-1 están asociados con el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática. La atención se centro en un SNP localizado en la posición -1607 p.b. de la región promotora del gen de MMP-1 y en un recién descubierto SNP localizado en la posición -755. Nuestros resultados mostraron que el genotipo 2G/2G y el alelo 2G del polimorfismo localizado en la posición -1607, se asocian a un mayor riesgo al desarrollo de la FPI; mientras la frecuencia genética del SNP localizado a -755 es

similar en el grupo de pacientes fibróticos y el grupo control, sin embargo cuando la población fue estratificada en su condición de fumar, se encontró que el genotipo T/T se asocia con un riesgo al desarrollo de FPI en pacientes fumadores. Por otra parte, en fibróticos fumadores la frecuencia del haplotipo 2G⁻¹⁶⁰⁷/T⁻⁷⁵⁵ se encuentra incrementada con respecto a controles fumadores. De manera interesante, se encontró que el factor de transcripción *AP-1*, está asociado con estos sitios polimórficos. Estos hallazgos nos sugieren que estos polimorfismos en el promotor de la MMP-1 están asociados al desarrollo de la enfermedad, quizás, vía su asociación con el factor de transcripción *AP-1*. Además, estos SNPs podrían estar involucrados en una interacción gen-ambiente que podría modular la susceptibilidad a la FPI.

La frecuencia de los genotipos 2G/2G se encuentra incrementado en sujetos con FPI, indicando que este genotipo puede modular la susceptibilidad a esta enfermedad. De forma interesante, se han reportado resultados similares en desordenes crónicos de hígado donde se encontró un aumento de la frecuencia del genotipo homocigoto 2G en pacientes con cirrosis hepática comparada con pacientes con cirrosis provocada por infección de virus de hepatitis C (53). Por otra parte es bien sabido que el alelo 2G del SNP -1607 crea una secuencia consenso 5'-GGA-3', que es una secuencia de unión para factores de transcripción de la familia Ets. Mediante ensayos *in vitro* se ha demostrado que el alelo 2G muestra una actividad transcripcional más alta que células que contienen el alelo 1G (64). Nuestros resultados demostraron que fibroblastos provenientes de pacientes con FPI que contienen el genotipo 2G/2G muestran un incremento en

la expresión de MMP-1. Además estudios recientes han demostrado que este SNP, junto con un sitio de unión *AP-1*, afecta significativamente la inducción de esta enzima en respuesta a peróxido de hidrogeno (61), y que la producción de MMP-1 es más alta en fibroblastos de prepucio humano homocigotos 2G comparados con homocigotos 1G, cuando éstos, son estimulados con el factor de crecimiento epidermal (EGF) o interleucina 1 (90). Y aún cuando los detalles de como el alelo 2G puede incrementar el riesgo a la enfermedad no es bien conocida, se ha sugerido que este se debe a un incremento en la actividad transcripcional de la enzima. Este incremento se vería reflejado en niveles mayores de proteína que podrían tener un impacto negativo sobre la remodelación tisular del pulmón y este desorden puede aumentar el riesgo al desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática.

Por otra parte el polimorfismo en la posición -755 (G>T) del promotor de la MMP-1 mostró una asociación al desarrollo de FPI en pacientes fumadores. Y es que el hecho de fumar ha sido asociado con la FPI en numerosos estudios de casos-control con pacientes de diferentes poblaciones así como en pacientes de fibrosis pulmonar idiopática familiar indicando que un historial de fumador confiere un riesgo al desarrollo de la enfermedad (79, 76). En este contexto nuestros resultados indican que el SNP -755 podría modular una interacción en fumadores, dando como resultado un incremento en la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad.

Cabe señalar que en la literatura han sido reportados resultados similares para este y otros genes en otras enfermedades humanas. Por ejemplo, se ha demostrado que el genotipo 2G/2G del promotor de la MMP-1 en la región -1607 aumenta la susceptibilidad a cáncer pulmonar en fumadores (97). Por otro lado, un polimorfismo en el receptor para Vitamina D en la posición -1056 se ha asociado con la presencia y progresión de peritonitis en fumadores, mientras que en sujetos no fumadores no existe tal asociación (51). Cuando la región -755 polimórfica fue sujeta a un análisis de unión a posibles factores de transcripción usando el software TRANSFAC, se encontró un posible sitio de unión para un sitio *AP-1* en la secuencia que contenía el alelo T, lo cual fue corroborado posteriormente por un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). En conjunto, estos resultados indican que el factor de transcripción *AP-1* puede ser un factor importante en la patogénesis de la FPI especialmente en el contexto de los polimorfismos investigados en este estudio.

Aunque el papel que desempeña la MMP-1 en la FPI no es todavía claro, se ha demostrado que esta enzima es expresada principalmente por células de epitelio alveolar, pero también por macrófagos de pacientes fumadores (66), pero su presencia en el espacio intersticial, donde se lleva la acumulación de colágena, es nula.

De este modo, y basados en los resultados del presente trabajo, donde los alelos y haplotipos de estos dos sitios polimórficos mostraron una asociación con la susceptibilidad al desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática, y con antecedentes de la literatura, se postula que ambos sitios polimórficos (-1607 y -755) desempeñan un papel importante en la patogénesis de la FPI, probablemente basado en su habilidad de modular la regulación transcripcional, donde el factor de transcripción *AP-1* puede estar involucrado. Además, es probable que ocurran interacciones gen-ambiente (el hecho de fumar) influyendo en estos dos SNPs, modulando así, su transcripción vía *AP-1*. Finalmente, es necesario confirmar el presente estudio en otras poblaciones para asegurar la participación de estos polimorfismos en el desarrollo de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. American Thoracic Society. **Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS).** *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:646-664.
2. Aumailley M, Gayraud B. **Structure and biological activity of the extracellular matrix.** *J. Mol. Med.* 1998; 76: 253-265.
3. Baumgartner KB, Samet JM, Coultas DB, Stidley CA, Hunt WC, Colby TV, Waldron JA. **Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study. Collaborating Centers.** *Am J Epidemiol.* 2000; 152:307–315.
4. Benbow U, Brinckerhoff CE. **The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the fuss about?** *Matrix Biol,* 1997; 15: 519–526.
5. du Bois RM. **The genetic predisposition to interstitial lung disease: functional relevance.** *Chest.* 2002; 121(3 Suppl):14S-20S.
6. Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. **Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript.** *Oncogene* 1995; 11:1005-11.
7. Betsuyaku, Y. Fukuda, W.C. Parks, J.M. Shipley, R.M. Senior. **Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin,** *Am. J. Pathol.* 2000; 157: 525–535.
8. Birkedal - Hansen H. **Matrix metalloproteinases: a review.** *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993; 4: 197-250.

9. Birkedal-Hansen Henning. **Proteolytic remodeling of Extracellular matrix.** *Current opinion in cell biology.* 1995; 7:728-735.
10. Botstein D, Risch N. **Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease.** *Nat. Genet.* 2003; 3:228-37.
11. Brinckerhoff C.E, Matrisian L.M., **Matrix metalloproteinases: A tail of a frog that became a prince,** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002 3: 207–214.
12. Brown J.C, Timpl R. **The collagen superfamily.** *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995; 107:484.
13. 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; 39:2324–2338.
14. Cargill M, Altshuler D, Ireland J. **Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes.** *Nat. Genet.* 1999; 22, 231–238.
15. Carrere S, Verger A, Flourens A, Stehelin D, Dutertre-Coquillaud M. **Erg proteins, transcription factors of the Ets family form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains.** *Oncogene,* 1998; 16: 3261–3268.
16. Cauwe B., Van den Steen P, Opdenakker G. **The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases.** *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2007; 42 :113–185.

17. Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A. **Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation.** *Science.* 1997; 278:1580-81.
18. Conant K, Haughey N, Nath A, St Hillaire C, Gary DS, Pardo CA, Wahl LM, Bilak M, Milward E, Mattson MP. **Matrix metalloproteinase-1 activates a pertussis toxin-sensitive signaling pathway that stimulates the release of matrix metalloproteinase-9,** *J. Neurochem.* 2002; 82: 885–893.
19. Chiu R, Angel P, Karin M. **Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun.** *Cell,* 1989; 59: 979–986.
20. Chunhong Y, Boyd D. **Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression.** *J. Cell. Physiol.* 2007, 211: 19–26.
21. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. **Transforming growth factor beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblast.** *J Cell Biol.* 1993; 122(1), 103-111.
22. Doyle GAR, Pierce RA, Parks WC. **Transcriptional induction of collagenase-1 in differentiated monocyte-like (U937) cells is regulated by AP-1 and an upstream C/EBP- β site.** *J Biol Chem,*1997; 272: 11840–11849.
23. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV. **Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor.** *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12:205-16.
24. Dumin JA, Dickeson SK, Stricker TP, Bhattacharyya-Pakrasi M, Roby JD, Santoro SA, Parks WC. **Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1)**

- binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen.** *J. Biol. Chem.* 2001; 276:29368–29374.
25. Elander N, Soderkvist P, Fransen K. **Matrix metalloproteinase (MMP) -1, -2, -3 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer.** *Anticancer Res.* 2006; 26: 791–795.
26. Falfán-Valencia R, Camarena A, Juárez A, Becerril C, Montaña M, Cisneros J, Mendoza F, Granados J, Pardo A, Selman M. **Major histocompatibility complex and alveolar epithelial apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Hum Genet.* 2005; 118(2):235-44.
27. Fang S, Jin X, Wang R, Li Y, Guo W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wei L, Zhang J.. **Polymorphisms in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small cell lung carcinoma in North China.** *Carcinogenesis.* 2005; 26:481–486.
28. Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE..**Regulation of matrix metalloproteinase gene expression.** Parks WC, Mecham RP, editors. Matrix metalloproteinases. New York: Academic. 1988; pp 299–359.
29. Harendza S, Lovett DH, Panzer U, Lukacs Z, Kuhn P, Stahl RAK. **Linked common polymorphisms in the gelatinase A promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness.** *J Biol Chem.* 2003; 278:20490–20499.
30. Haston CK, Amos CI, King TM, Travis EL. **Inheritance of susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the mouse.** *Cancer Res.* 1996; 1;56(11):2596-601.

31. Hettiaratchi A, Hawkins NJ, McKenzie G, Ward RL, Hunt JE, Wakefield D, Di Girolamo N. **The collagenase-1 (MMP-1) gene promoter polymorphism – 1607/2G is associated with favourable prognosis in patients with colorectal cancer.** *Br J Cancer.* 2007; 96: 783–792.
32. Hunninghake GW, Schwarz MI. **Does current knowledge explain the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? A perspective.** *Proc Am Thorac Soc.* 2007; 4:449-452.
33. HutYROVÁ B, Pantelidis P, Drábek J, ZůrkOVÁ M, Kolek V, Lenhart K, Welsh KI, Du Bois RM, Petrek M. **Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 15;165(2):148-51.
34. Hyun-Jeong Ra, William C. Parks. **Control of matrix metalloproteinase catalytic activity.** *Matrix Biol.* 2007; 26(8): 587-596.
35. Jormsjo S, Ye S, Moritz J, Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM, Henney A, Hamsten A, Eriksson P. **Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease.** *Circ Res* 2000; 86:998–1003.
36. Javaheri S, Lederer DH, Pella JA, Mark GJ, Levine BW. **Idiopathic pulmonary fibrosis in monozygotic twins. The importance of genetic predisposition.** *Chest.* 1980; 78(4):591-594.
37. Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, Terakawa N, Nakamura Y. **Correlation between expression of the matrix**

- metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region.** *Cancer Res.* 1999; 59:4225–4227.
38. Karin M, Liu ZG, Zandi F. **Ap-1 function and regulation.** *Curr OpinCell Biol.* 1997; 9: 240–246.
39. Katzenstein ALA, Myers JL. **Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathological classification.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157:1301-1315.
40. Latsi PI, du Bois RM, Nicholson AG, Colby TV, Bisirtzoglou D, Nikolakopoulou A, Veeraraghavan S, Hansell DM, Wells AU. **Fibrotic idiopathic interstitial pneumonia: the prognostic value of longitudinal functional trends.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168:531–537.
41. Latsi P, Pantelidis P, Vassilakis D, Sato H, Welsh KI, du Bois RM. **Analysis of IL-12 p40 subunit gene and IFN-gamma G5644A polymorphisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.** *Respir Res.* 2003;4:6.
42. Lemay AM, Haston CK. **Bleomycin-induced pulmonary fibrosis susceptibility genes in AcB/BcA recombinant congenic mice.** *Physiol Genomics.* 2005 Sep 21;23(1):54-61.
43. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. **Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury,** *Cell.* 2002; 111:635–646.
44. Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, Hansen JA. **Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host**

- disease and survival after hematopoietic-cell transplantation.** *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 2201-10.
45. Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, Khaw PT. **Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis,** *Am. J. Pathol.* 2005; 166: 1555–1563.
46. López-Otín C, Matrisian LM. **Emerging roles of proteases in tumor suppression.** *Nat Rev Cancer.*2007; 7:800-808.
47. Massova I, Kotra L, Fridman R, Mobashery S. **Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification.** *FASEB J.* 1998; 12:1075-1095.
48. Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO, Laurent GJ. **Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom.** *Thorax.* 2000; 55(2):143-6.
49. McIntyre J.O. and. Matrisian L.M, **Molecular imaging of proteolytic activity in cancer.** *J. Cell Biochem.* 2003; 99: 1087–1097.
50. Nagase H., Woessner B. **Matrix metalloproteinases.** *J. Bio. Chem.* 1999; 274: 21491-21494.
51. Nibali L, Parkar M, D'Aiuto F, Suvan JE, Brett PM, Griffiths GS, Rosin M, Schwahn C, Tonetti MS. **Vitamin D receptor polymorphism (-1056 Taq-I) interacts with smoking for the presence and progression of periodontitis.** *J Clin Periodontol.* 2008; 35:561-567.
52. Noble PW, Homer RJ. **Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into pathogenesis.** *Clin Chest Med.* 2004; 25:749–58.

53. Okamoto K, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I. **Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease.** *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20:1102-1108.
54. Pardo A. **La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena.** *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp.* 1993; 6:156.
55. Pardo A., Selman M. **Matrix metalloproteinases and lung injury.** *Braz. J. Med. Biol. Rev.* 1996; 29: 1109-1115.
56. Pardo A, Selman M. **Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis.** *Front Biosci.* 2002; 1:7, 1743- 1761.
57. Pardo A, Selman M. **MMP-1: the elder of the family.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37:283-288.
58. Pardo A, Selman M. **Matrix metalloproteases in the aberrant fibrotic tissue remodeling.** *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3: 383-388.
59. Pardo A, Selman M, Kaminski N. **Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40:1141-1155.
60. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. **Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. Role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation.** *J Biol Chem* 2001; 276:7549–7558.
61. Ranganathan AC, Nelson KK, Rodriguez AM, Kim KH, Tower GB, Rutter JL, Brinckerhoff CE, Huang TT, Epstein CJ, Jeffrey JJ, Melendez JA. **Manganese**

- superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation.** *J. Biol. Chem.* 2001; 276:14264-14270.
62. Riha RL, Yang IA, Rabnott GC, Tunnicliffe AM, Fong KM, Zimmerman PV. **Cytokine gene polymorphisms in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Intern Med J.* 2004; 34(3):126-9.
63. Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, Lindell KO, Cisneros J, Macdonald SD, Pardo A, Sciruba F, Dauber J, Selman M, Gochuico BR, Kaminski N. **MMP-1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis.** *PLoS Med.* 2008; 5(4):e93.
64. Rutter JL, Benbow U, Coon CI, Brinckerhoff CE. **Cell-type specific regulation of human interstitial collagenase-1 gene expression by interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human fibroblasts and BC-8701 breast cancer cells.** *J Cell Biochem.* 1997; 66: 322–336.
65. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. **A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription.** *Cancer Res.* 1998; 58: 5321-5325.
66. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A. **TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment?** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279:L562-574.

67. Selman M, King TE, Pardo A. **Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevaling and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy.** *Ann Intern Med.* 2001; 134: 136-151.
68. Selman M, Pardo A. **Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder.** *Respir Res.* 2002; 3:3.
69. 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.* 2006; 173:188-198.
70. Selman M, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, Cisneros J, Gaxiola M, Pérez-Padilla R, Navarro C, Richards T, Dauber J, King TE Jr, Pardo A, Kaminski N. **Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern.** *PLoS ONE.* 2007; 2(5):e482.
71. Shapiro S.D. **Matrix metalloproteinases degradation of extracellular matrix: biological consequences.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1998; 10: 602-608.
72. Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR. **The ETS-domain transcription factor family.** *Int J Biochem Cell Biol* , 1997; 12: 1371–1387.
73. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. **dbSNP –Database for single nucleotide polymorphisms and other clases of minor genetic variation.** *Genome Res.* 1999; 9: 667-79.
74. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. **dbSNP: The NCBI database of genetic variation.** *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:308-11.

75. Schwarzbauer JE, Sechler JL. **Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm from extracellular matrix assembly.** *Curr. Op. Struct. Biol.* 1999; 11: 622-627.
76. Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, Burch LH, Wahidi MM, Phillips JA 3rd, Sporn TA, McAdams HP, Schwarz MI, Schwartz DA. **Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:1146–1152.
77. Streuli Charles. **Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation.** *Current opinion in cell biology.* 1999; 11:634-640.
78. Strieter RM. **Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel.** *Chest.* 2005. 128 (5 Suppl 1):526S-532S.
79. Taskar VS, Coultas DB. **Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease?** *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:293-298.
80. Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. **Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung.** *Am J Physiol.* 1998; 275:L1192-9.
81. Van der Rest M, Garrone R. **The collagen family of proteins.** *FASEB J.* 1992; 5 :2814-2823.
82. Van der Rest M, Bruckner P. **Collagens: diversity at the molecular and supramolecular levels.** *Current Opinion in Structural Biology.* 1996; 3:430-436.

83. Vasakova M, Striz I, Slavcev A, Jandova S, Kolesar L, Sulc J. **Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.** *Tissue Antigens.* 2006; 67(3):229-32.
84. Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE. **Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): Mechanism that control enzyme activity, transcription and mRNA stability.** *Crit Rev Eukaryol Gene Exp,* 1996; 6: 391–411.
85. Warshamana GS, Pociask DA, Sime P, Schwartz DA, Brody AR. **Susceptibility to asbestos-induced and transforming growth factor-beta1-induced fibroproliferative lung disease in two strains of mice.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 27(6):705-13.
86. Westermarck J, Seth A, Kahari V-M. **Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors.** *Oncogene,* 1997; 14: 2651–2660.
87. Westermarck J, Kahari V-M. **Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion.** *FASEB J,* 1999; 13: 781–792.
88. Willenbrock F, Murphy G. **Structure-function relationships in tissue inhibitors of metalloproteinases.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 150: s165-s170.
89. Woessner Frederick. **The Matrix metalloproteinases family.** In **Matrix Metalloproteinase.** Ed. Parks WC, Mechem Academic Press. 1998; 1-14.
90. Wyatt CA, Coon CI, Gibson JJ, Brinckerhoff CE. **Potential for the 2G single nucleotide polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase to**

- enhance gene expression in normal stromal cells.** *Cancer Res.* 2002; 62:7200–7202.
91. Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, Ancochea J, Morell F, Ruiz-Manzano J, Rodriguez-Becerra E, Rodriguez-Arias JM, Inigo P, Sanz S, Campistol JM, Mullol J, Picado C. **Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168(4):410-1.
92. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. **Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression.** *J Biol Chem.* 1996; 271:13055–13060.
93. Yu C, Pan K, Xing D, Liang G, Tan W, Zhang L, Lin D. **Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer.** *Cancer Res.* 2002; 62: 6430–6433. 76.
94. Yu C, Zhou Y, Miao X. **Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer.** *Cancer Res* 2004; 64: 7622–7628.
95. Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. **Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility.** *Carcinogenesis* 2005; 26: 1117–1121.
96. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. **Functional**

- polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis.** *Circulation.* 1999; 99: 1788–1794.
97. Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X. **A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility.** *Cancer Res.* 2001; 61:7825-7829.
98. Zorzetto M, Ferrarotti I, Trisolini R, Agli LL, Scabini R, Novo M, De Silvestri A, Patelli M, Martinetti M, Cuccia M, Poletti V, Pozzi E, Luisetti M. **Complement receptor 1 gene polymorphisms are associated with idiopathic pulmonary fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168(3):330-4.
99. Zorzetto M, Ferrarotti I, Campo I, Trisolini R, Poletti V, Scabini R, Ceruti M, Mazzola P, Crippa E, Ottaviani S, Agostini C, Semenzato G, Pozzi E, Luisetti M. **NOD2/CARD15 gene polymorphisms in idiopathic pulmonary fibrosis.** *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2005; 22(3):180-5.).
100. 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 USA.* 2002; 99: 6292