



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Expresión de ADAMTS-9 en Fibrosis Pulmonar  
Idiopática (FPI)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**IVETTE RIZO PASTRANA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. ANNIE PARDO CEMO  
2011**



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.

1. Datos del alumno:  
Rizo  
Pastrana  
Ivette  
47520477  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Bilología  
405024506
2. Datos del tutor  
Doctora  
Annie  
Pardo  
Cemo
3. Datos sinodal 1  
Doctor  
V́ctor Manuel  
Valdés  
López
4. Datos sinodal 2  
Doctora  
María Genoveva  
González  
Morán
5. Datos sinodal 3  
María de Lourdes  
Segura  
Valdes
6. Datos sinodal 4  
Jorge Antonio  
García  
álvarez
7. Datos del trabajo escrito  
Expresión de ADAMTS-9 en Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)  
40p  
2011

# Índice

---

AGRADECIMIENTOS.....	6
RESUMEN.....	7
<b>1. Introducción</b> .....	<b>8</b>
1.1 PROTEASAS.....	8
1.2 METALOPROTEASAS .....	9
1.3 LA FAMILIA ADAMTS: SUS CARACTERÍSTICAS Y REGULACIÓN.....	11
1.3.1 FUNCIÓN DE LA FAMILIA M12: ADAMTS EN ACCIÓN .....	13
1.3.1.1 AGRECANASAS.....	13
1.3.1.2 PROCOLAGENASAS N-COLAGENASAS .....	14
1.3.1.3 ALGUNAS FUNCIONES ASOCIADAS A ADAMTS .....	15
1.4 ADAMTS-9.....	16
1.4.1 ADAMTS-9: SU REGULACIÓN Y SU EXPRESIÓN .....	17
1.4.2 PRESENCIA DE LA ADAMTS-9 EN DIFERENTES PATOLOGÍAS.....	18
1.5 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI): Características y Epidemiología...	18
1.5.1 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI): Patogénesis .....	19
1.5. 2 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA: Las células epiteliales activadas anormalmente, transición epitelio mesénquima claves probables de esta patología.....	19
1.5.3 ADAMTS-9 Y FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA.....	21
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Material y Métodos</b> .....	<b>24</b>
3.1 Datos de genómica .....	24
3.2 Población de Estudio .....	24
3.3 Inmunohistoquímica .....	25

3.4	Extracción de RNA.....	26
3.5	Reacción de la Transcriptasa Reversa.....	26
3.6	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real .....	27
4.	Resultados .....	31
4.1	Inmunohistoquímica de la ADAMTS-9 .....	31
4.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real.....	33
5.	Discusión.....	34

"Elaboremos en adelante una moral más modesta, pero capaz de producir efectos reales. Tampoco una ética del héroe y del santo, sino una ética del sabio"

Michel Onfray

## **AGRADECIMIENTOS**

En realidad este tipo de formalidades deberían ser personales, tomando un café (o la bebida de su preferencia) y poder dar un abrazo fuerte, sin embargo, es una oportunidad de plasmarlo y hacerlo público.

El camino que he recorrido (sin presunciones) ha sido largo pero con muchas experiencias que aún quedan por analizar.

A mi madre, mi familia, si no mal recuerdo en su tesis escribí "el camino está marcado", yo quiero agregar que con tu ejemplo no sólo me has enseñado a dibujar un camino, también me has enseñado (entre muchas otras cosas) a romper las cadenas de odio con amor, como dice Onfray, "Maduramos de verdad, cuando ofrecemos a los que nos arrojaron a los perros, sin saber lo que hacían, un gesto de paz necesario para llevar una vida sin resentimientos". Es la conclusión de un ciclo académico donde dependió mucho ti la formación académica y personal. Me formaste un individuo independiente y eso ha sido una gran labor.

Al Doctor Felipe de Jesús Lara Rosano (va ha ser público por eso lo pongo completo), fuiste mi inspiración académica desde pequeña y con tu apoyo económico y moral he podido culminar esta etapa, si bien no con el impulso que al inicio tenía.

A mis compañeros de camino, que han enriquecido de muy diversas formas mi andar y espero haber enriquecido el suyo.

A la Doctora Annie Pardo por permitirme trabajar dentro de su grupo de investigación y sin su apoyo académico esta tesis no hubiera podido ser.

# RESUMEN

---

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una enfermedad crónica y progresiva de origen desconocido que se caracteriza por daño y activación del epitelio alveolar, proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y un depósito exagerado de moléculas de matriz extracelular que trae como consecuencia la desorganización de la arquitectura del parénquima pulmonar y la pérdida del intercambio gaseoso. Muchos de los mecanismos detrás de esta grave remodelación patológica involucran la expresión y regulación descoordinada de varias metaloproteasas de matriz. En un estudio reciente realizado por microarreglos se detectó en FPI la sobreexpresión de la metaloproteasa ADAMTS 9. Las ADAMTS son una familia de metaloproteasas y desintegrina con motivos de trombospondina que se secretan al espacio extracelular. El objetivo de este estudio fue verificar por PCR en tiempo real la sobreexpresión de esta enzima en FPI y por inmunohistoquímica la localización de la misma. Los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativas entre FPI y pulmón normal en el análisis por PCR en tiempo real. Sin embargo, la enzima inmunoreactiva se observó preferentemente en los tejidos de FPI y se localizó en células intersticiales.

# 1. Introducción

---

## 1.1 PROTEASAS

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace peptídico, y son específicas a su sustrato, su importancia radica en su participación en diversos mecanismos celulares, como lo son la activación, inhibición o degradación de muchas otras proteínas, esto deriva en mantener una homeostasis ya sea celular, tisular hasta fisiológica (1, 2).

Su importancia reside en la acción catalítica, de degradar proteínas y obtener aminoácidos que probablemente se originó en etapas muy tempranas de la evolución de los organismos como principal adaptación. En las recientes investigaciones se han descrito los diversos papeles claves que desempeñan este grupo de enzimas (3).

Anteriormente las proteasas se clasificaban en endopeptidasas y exopeptidasas, esto, según el sitio donde las proteínas eran hidrolizadas, es decir, que las endopeptidasas hidrolizaban el enlaces peptídicos internos de una proteína y en referencia al término de exopeptidasas correponderían a los cortes ya sea en el amino terminal o carboxilo terminal (aminopeptidasas y carboxilopeptidasas respectivamente).

Actualmente se encuentran clasificadas en base a su dominio de catalítico, es decir, la porción de la proteína, donde se efectúa la catálisis y este dominio consiste en su mayoría en un aminoácido específico (cisteína, serina, treonina, ácido aspártico,) o un catión, ya sea de zinc o calcio, por lo tanto reciben el nombre de cisteínproteasas, treoninproteasas, aspartilproteasas, serinproteasas y por último las metaloproteasas(1,-3)(Figura 1).

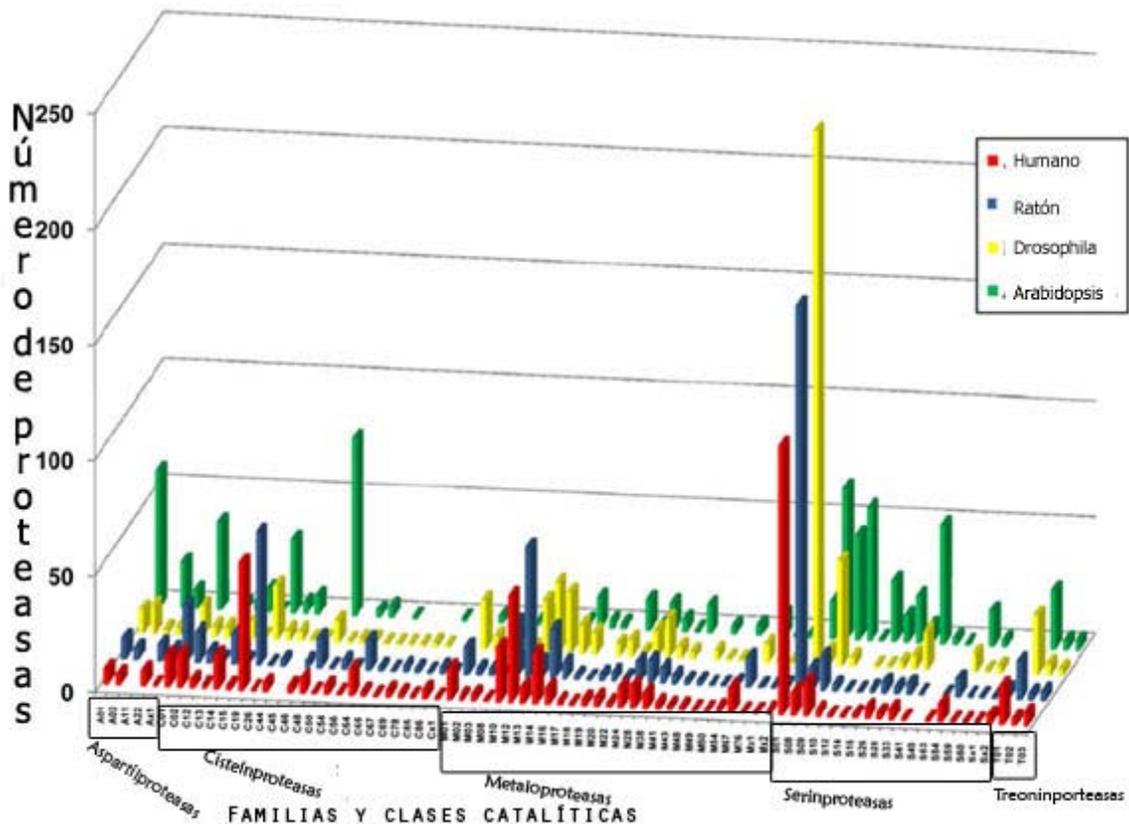


Fig. 1 Familias y Clases Catalíticas de Proteasas (Aspartilproteasas, Cisteínproteasas, Metaloproteasas, Serínproteasas, Treoninproteasas) identificadas en Humano, ratón, *Drosophila* y *Arabidopsis* (3)

En humano se tienen registrados 570 genes homólogos, de los cuales 21 pertenecen a aspartilproteasas, 153 a cisteínproteasas, 178 a serínproteasas, 27 a treoninproteasas y 191 a metaloproteasas, siendo estas últimas las más diversas con 54 familias. (1,3- 5)

### 1.2 METALOPROTEASAS

Dentro de las características principales de las metaloproteasas, se encuentran la presencia de un catión de metal bivalente, que en muchos casos es el catión de zinc, este catión en interacción con una molécula de agua, que es usada como nucleófilo funciona para hidrolizar el enlace peptídico. Este ion de metal bivalente se encuentra unido a tres residuos de aminoácidos que son conservados ya sea de Histidina (H), Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E) o Lisina (K). Se han encontrado 14 clanes, descritos en la base de datos de MEROPS, estos son MA, MC, MD, ME, MJ, MK, MM, MO y MP (donde M proviene de metaloproteasas y la segunda sigla es de significado

variable) las cuales presentan un ion de metal que en su mayoría es de zinc, en lo que se refiere a los clanes MF, MG, MH y MQ presentan dos iones en su región catalítica (6)(5)(1)

El clan MA es donde se encuentra el subclan de las metzincinas, cuya característica principal es el motivo de unión de tres histidinas unidas al ion de zinc y una metionina conservada formando lo que conoce como el "Met.Turn" hacia el carboxilo terminal. Este clan contiene 30 familias, donde se encuentran clasificadas las metaloproteasas de matriz (matrixinas) y las astacinas/adamalsinas, pertenecientes a las familias M10 y M12 (5).

Las Metaloproteasas de Matriz (MMPs, por sus siglas en inglés) pertenecen a la familia M10 clasificadas como sub familia de las matrixinas, con 23 miembros y 24 genes que codifican para estas proteínas, en su mayoría son proteínas secretadas y presentan dentro de sus características principales un propéptido de aproximadamente 80 aminoácidos, un dominio catalítico de alrededor de 170 aminoácidos un péptido de tamaño variable, que generalmente contienen un dominio de tipo hemopexina de aproximadamente 200 aminoácidos (7). La familia M12, la familia de las astacinas y de las adamalcinas, tiene 21 miembros identificados, generalmente son proteínas secretadas, las proteínas maduras de esta familia son todas endopeptidasas, además de las histidinas conservadas se tiene un ácido glutámico en el motivo de unión al ion de zinc, la presencia de los dominios de desintegrina y trombospondina-desintegrina, su actividad se encuentra regulada por el "swich" de cisteína, además del "Met-turn" conservado en el clan. En lo que concierne a la subfamilia M12 B, se encuentran las metaloproteasas ADAMTS (5).

### 1.3 LA FAMILIA ADAMTS: SUS CARACTERÍSTICAS Y REGULACIÓN.

Las ADAMTS son metaloproteasas que tienen como característica específica por lo menos una repetición de trombospondina tipo uno, es una familia con 19 miembros descritos en el humano, son proteínas conservadas, que probablemente han surgido en la evolución temprana de los deuterostomados, con homologías descritas en *C. elegans* y *Drosophila*. Son proteínas secretadas, que se sintetizan como preproenzimas, con las siguientes características (que van del amino al carboxilo terminal): Un péptido señal, un prodominio, que preserva la latencia enzimática, un dominio con el catión de zinc unido a un motivo del tipo reposilina, una región conservada de HEXXHXXG/N/SXXHD donde el residuo del ácido aspártico es característico de las familias ADAM y ADAMTS, así como una metionina entre los residuos de V/I/M/A/S (Valina (V), Isoleucina(I), Metionina(M), Alanina (A), Serina (S)) siendo la glicina la que da un giro río abajo de la histidina unida al catión de zinc. Otra característica es el dominio de desintegrina, seguido de una región central de trombospondina tipo 1, un dominio conservado rico en cisteínas, una región variable entre las ADAMTS cuya función se desconoce, una región espaciadora, finalizando con un número variable de repeticiones de trombospondina antes del carboxilo terminal (Figura 2). Una característica adicional, de los miembros de la familia de las ADAMTS, es su unión a la matriz extracelular (8-9)

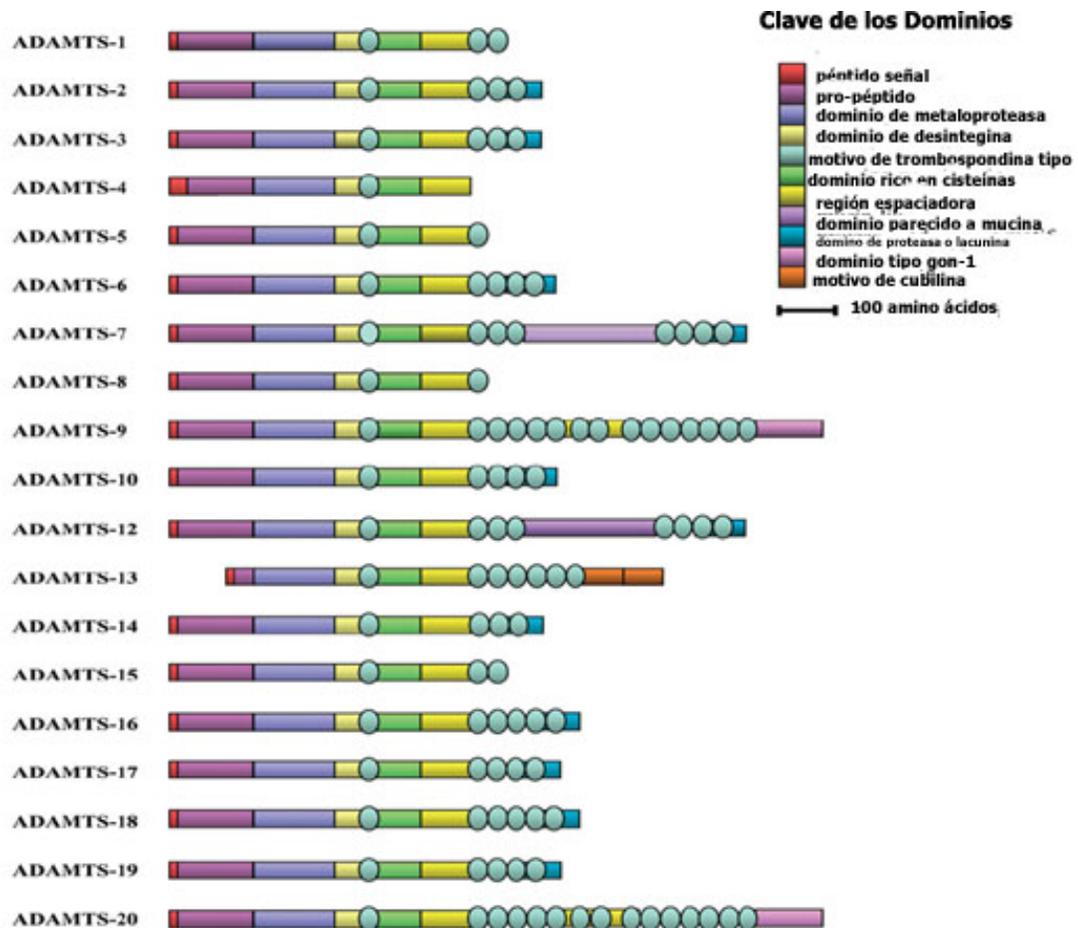


Fig. 2. Integrantes de la Familia ADAMTS y cada uno de los dominios característicos de los miembros pertenecientes. (8)

La expresión de los genes para muchas de las ADAMTS puede encontrarse en diferentes órganos en bajas cantidades, otras ADAMTS pueden ser expresadas exclusivamente en ciertos tejidos, sin embargo en condiciones patológicas se pueden encontrar sobre reguladas. Su regulación génica aún no se ha estudiado a fondo, sin embargo se ha encontrado que pueden ser reguladas por hormonas, factores de crecimiento y citocinas como lo son el Factor Transformante de Crecimiento (TFG- $\beta$ ), Interleucina 1 (IL- $\alpha$ ) (8, 10-11)

Los dominios característicos de las ADAMTS, ya descritos anteriormente, proveen a la proteína con la capacidad de una la potencial generación de isoformas de este grupo es principalmente por splicing alternativo, siendo este mecanismo el más importante para la diversidad de esta familia de proteínas, se pueden encontrar en una región 5' de mRNA varios codones de inicio río arriba seguidos de cortos marcos de lectura abierta (8,11).

Las modificaciones post-traduccionales, como lo es la adición de carbohidratos en el amino terminal, así como la adición de manosa a los motivos WXXW (Triptofano (W) Cualquiera (X)) y CXX(S/T)CG (Cisteína(C), cualquiera (X), Serina (S), Treonina (T), Glicina (G)) de las regiones de repeticiones de trombospondina (TSRs), la O-fucosilación es esencial para el plegamiento de las enzimas de esta familia, también el proceso de eliminación del prodominio, es crítico para su regulación post-traducciona. Este proceso es llevado a cabo por las proteínas convertasas, la más usual es la familia de furinas y esto ocurre en la región trans del Golgi. El prodominio no se encuentra como el switch de cisteína como se describe para las MMPs de la familia M10, sólo algunos miembros de la familia de las ADAMTS lo conserva, en cuanto a la especificidad de las ADAMTS, esta depende del corte de las regiones espaciadoras y así se determina la actividad de cada una de las enzimas de esta familia (8-9)

### **1.3.1 FUNCIÓN DE LA FAMILIA M12: ADAMTS EN ACCIÓN**

Las ADAMTS, que como ya se mencionó, son enzimas secretadas, han sido analizados por el papel que tiene en diferentes patologías en humanos y ratones y en invertebrados como lo son *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* (8-10). Entre las funciones que se han descrito se pueden encontrar la degradación de diferentes componentes de la Matriz Extracelular. A continuación se describe como se han agrupado las enzimas de esta familia.

#### **1.3.1.1 AGRECANASAS**

Los agrecanos son grandes agregados de proteoglicanos, moléculas que forman parte de la matriz extracelular, tiene dos cadenas globulares hacia el amino terminal y una hacia el carboxilo terminal (G1, G2 y G3 respectivamente), de las cuales entre G2 y G3 se encuentran espaciadas por varias cadenas de condroitin sulfato (CS) y keratan sulfato (KS), las primeras organizadas en dominios CS1 y CS2 y la región rica en KS, adicionalmente tiene un dominio intraglobular (IGD) de 150 aminoácidos y se encuentra entre los dominios globulares G1 y G2. Los grandes agregados de agrecanos se forman a partir de un filamento central de ácido hialurónico a los que se unen los monómeros de agrecanos por el dominio globular G1, estos agregados son importantes fisiológicamente, pues los asegura dentro de la red de colágena (12-13)(Figura3)

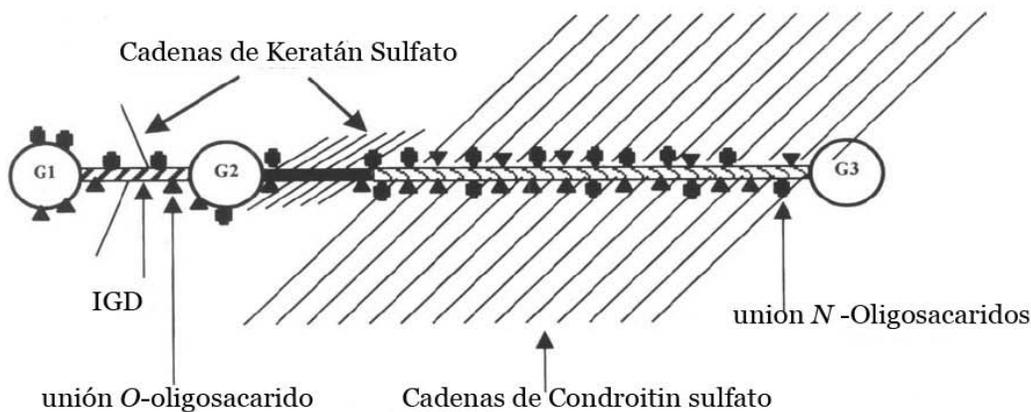


Figura 3. Esquema de la estructura de los agreganos (12)

Dentro de la familia de las ADAMTS, se han descrito a varios miembros con la actividad catalítica de agreganasas, entre las cuales se encuentran la ADAMTS-1, -4, -5, -8 y -9, siendo catalíticamente más eficiente la ADAMTS-5 (13) (14)

El sitio de corte de los agreganos se encuentra principalmente en el dominio IGD, en los aminoácidos E<sup>373</sup> y A<sup>374</sup> (glutámico y alanina respectivamente), siendo una característica de la catálisis por agreganasas, específicamente de las ADAMTS-4 y -5 que catalizan adicionalmente en la región rica en CS entre los dominios globulares G2 y G3. Por otro lado la ADAMTS-1, que también se considera una agreganasa por su catálisis en el enlace E<sup>1480</sup>-G<sup>1481</sup> agreganos de bovinos, (8, 13,15).

El motivo de trobospondina (TSP) hacia el carboxilo terminal de las ADAMTS agreganasas juega un papel importante en el reconocimiento del sitio de catálisis en los GAG (por sus siglas en inglés) (13).

La inhibición de estas enzimas se da por inhibidores tisulares de metaloproteasas "TIMP" (por sus siglas en inglés), en específico el TIMP-3, inhibe a la ADAMTS -4, -5 y -1 (15).

### 1.3.1.2 PROCOLAGENASAS N-COLAGENASAS

Las colágenas son una familia de proteínas componentes de la matriz extracelular, que se caracterizan por tener una estructura de triple hélice compuesta por tres cadenas polipeptídicas. Esta clasificación, está basada en su estructura supramolecular. Dentro esta clasificación se encuentran, entre otras, las colágenas fibrilares.

Las colágenas fibrilares son catalizadas por las ADAMTS-2, -3 y 14(15), estas enzimas cortan las regiones globulares de las procolágenas fibrilares, aunque es de mayor importancia el proceso de corte en el carboxilo terminal (16)

### 1.3.1.3 ALGUNAS FUNCIONES ASOCIADAS A ADAMTS

La ADAMTS 13 se ha asociado con la trombosis y es responsable de la proteólisis del Factor de Von Willenbrand (vWF), que es producido a su vez por las células endoteliales y megacariocitos. La ADAMTS-13 cataliza el enlace peptídico de Y<sup>1605</sup>-M<sup>1606</sup> (Tirosina-Metionina) del factor de glicoproteína plasmática (9,17)

La deficiencia de esta enzima se encuentra caracterizada en la patología de trombocitopenia trombótica púrpura, enfermedad que es transmitida genéticamente provocando autoinmunidad hacia la ADAMTS 13, sin embargo no es un factor determinante de la misma.(16-17).

Se ha encontrado que estas dos ADAMTS tienen una región conservada de diez cisteínas hacia el carboxilo terminal, región que es homóloga a la GON-1 *del Caenorhabditis elegans* (8). Su actividad catalítica se encuentra catalogadas como hialectanasas (11). Ambas enzimas se encuentran expresadas durante el desarrollo embrionario.

La ADAMTS-1 es el prototipo de la familia, sin embargo se han encontrado con diferentes funciones biológicas entre las cuales se encuentran la de agrecanasa (13,15). También se ha demostrado que es determinante en el desarrollo embrionario principalmente se ha observado en el desarrollo en el epitelio urinario, así como en ovario (21) sin dejar de mencionar su acción inhibitoria de angiogenesis al igual que la ADAMTS-8 (10, 21)

También se encuentran como agrecanasas las ADAMTS-8, -9 Y -15 catalizando el sitio donde se une la región globular G1 al ácido hialurónico (11).

Las diferentes funciones en las cuales se encuentran involucradas las ADAMTS, pueden ser desempeñadas en cooperación entre los miembros de la familia. Se ha observado que las enzimas ADAMTS-5, -9, -20 se encuentran involucradas en la reabsorción de la redes interdigitales en ratón, por mencionar un ejemplo (9).

#### 1.4 ADAMTS-9

La ADAMTS-9 es una enzima de reciente descripción, en el año 2000 Melody E. Clark y colaboradores, mostraron características importantes de la enzima como son: a) su homología con la GON-1 de *Caenorhabditis elegans*, b) la descripción de su dominio de metaloproteasas HEXGHXXGXXHD donde la segunda glicina es sustituida por una asparagina, característica que comparte con las ADAMTS-1 y -4, c) además la ADAMTS-9 tiene el "switch" de cisteína, y dos potenciales cortes de furina para la maduración de la enzima, d) las cuatro repeticiones de trombospondina tipo 1 y e) localización en el cromosoma 3 en el brazo corto en la región 14 en la subregión 2 (24).

Someville y colaboradores, caracterizan más detalladamente, la proteína, en el 2003, y describen las catorce repeticiones más de Trombospondina tipo y su 64% de similitud y su 48% de identidad con la ADAMTS-20. (25)

La ADAMTS-9 es un gen de 137 kb, que se encuentra en el cromosoma 3p14, su marco de lectura es de 39 exones, y en cuanto a la maduración del RNA mensajero ocurre la excepción dentro de la familia, ADAMTS-9 y 20(25), ya que sus repeticiones de Trombospondina tipo 1 (TSR, por sus siglas en inglés) no se encuentran en un solo exón en dirección 5', como normalmente se encuentran, sino que se encuentran en diferentes exones de tamaño variable. Por ejemplo, en las repeticiones de Trombospondina 1, 2,3, donde las primeras dos se encuentran en dos diferentes exones y las uniones entre exones no tienen el mismo tamaño. La ADAMTS-9, tiene 1935 residuos de aminoácidos, donde, 126 son residuos de cisteína con los que se pueden predecir 63 puentes disulfuro intercatenarios y peso molecular de su secuencia de residuos de aminoácidos es de 216kDa, es decir, como proenzima y 184kDa en su forma madura o activa, al igual que la ADAMTS-20, la -9 tienen sitios específicos de glicosilación.

En la secuencia de residuos de aminoácidos, de la ADAMTS-9, EYS<sup>830</sup> GS<sup>832</sup>ETAVE que se encuentran en el dominio espaciador, coincide con el sitio de unión S<sup>830</sup> o S<sup>832</sup> a GAG (glucosaminoglicanos). En lo que se refiere al sitio catalítico de metaloproteasa la ADAMTS-9 es idéntico a la ADAMTS-1, que como característica se encuentra un residuo de Prolina (P) antes del tercer residuo de Histidina (H) coordinado con el ión de Zinc. La similitud de la ADAMTS-9 con la GON-1 del *Caenorhabditis Elegans* es del 46%, y se refleja en el sitio catalítico de la Metaloproteasa donde sólo cambian 2

aminácidos de los 14 que son variables, además de su sitio de corte en el propéptido para convertasas (Figura 4)(25)



Fig. 4 Esquema de los Dominios de la ADAMTS-9 dónde: S, se refiere al péptido señal; Pro, propéptido; Cat, dominio catalítico; Dis, motivo de disintegrina; TSR, repeticiones de trombospondina tipo1; CRD, región rica en cisteínas; Spacer, región espaciadora, L1 yL2 son regiones que unen a las repeticiones de trombospondina; GON-1, región del carboxilo terminal homóloga con GON-1 de *C. elegans* (Koo BM et al, 2006)

La activación ADAMTS-9 es llevado a cabo por las convertasas, el trabajo de Koo y sus colaboradores, mostró que es un miembro de la familia de las furinas que cataliza el prodominio de la proteína, y la catálisis ocurre en la superficie celular, el propéptido es esencial para su secreción así como la glucosilación del mismo y esta ocurre en los residuos N<sup>112</sup>, N<sup>135</sup> y N<sup>271</sup>, siendo también un paso importante para su secreción. Sin embargo, aclaran que el proceso de activación por furina, en la ADAMTS-9, disminuye su actividad proteolítica a versicanos (26-27).

La actividad de agrecanasa es una característica de la ADAMTS-9, y son esenciales los dominios auxiliares para esta actividad se efectúe, lo que ocurre en los residuos E<sup>1771</sup> y A<sup>1772</sup> de los agrecanos y E<sup>441</sup> –A<sup>442</sup> de los versicanos. (28).

#### 1.4.1 ADAMTS-9: SU REGULACIÓN Y SU EXPRESIÓN

La expresión de la ADAMTS-9 es inducida por la estimulación con las citocinas IL1-β y TNF-α independientemente, aunque ambas citocinas en sinergia aumenta la expresión de la misma, este efecto se observó en líneas celulares de condrosarcomas (29) También se ha descrito que interleucina-1β, induce la expresión de esta proteína por la cascada de señalización del Factor nuclear activado por células T(NFAT por siglas en inglés) (30)

Se ha descrito que la ADAMTS-9 se encuentra expresada durante el desarrollo embrionario en ratón; el RNA mensajero se encontró en los días 7 y 17 postcoito (pc). Por lo que se refiere a los humanos su expresión se ha localizado en órganos como corazón, placenta, músculo esquelético, riñón y ovario y testículo (25)

En la ovulación que es un proceso complejo que inicia con la hormona luteinizante se inducen cascadas de mensajes que permiten la expresión de diferentes genes, dentro de los cuales se encuentra la ADAMTS-9 (23)

#### ***1.4.2 PRESENCIA DE LA ADAMTS-9 EN DIFERENTES PATOLOGÍAS***

Esta metaloproteasa, la ADAMTS-9, se observa en diferentes patologías, ya sea bajo o sobre regulado, sin embargo no se tiene un conocimiento exacto del papel que desempeña en cada una de ellas.

En cáncer esofágico la hipermetilación del promotor de la ADAMTS-9 se asocia al desarrollo de tumores esofágicos, Lo y sus colaboradores, describen este efecto en líneas celulares carcinoma de células escamosas esofágicas (32).

En el modelo de oclusión arterial cerebral en rata, la expresión de la ADAMTS-9 está sobrerregulada, aumenta durante las primeras 4 horas hasta las 24 horas después de la lesión isquémica y retorna a sus niveles basales a las 120 hrs, en este trabajo de Reid y colaboradores, notan que esta metaloproteasa es expresada para incrementar la expresión de citocinas en el tejido cerebral en esta patología (33)

La ADAMTS-9 participa en el desarrollo del melanoblasto y es supresor de tumores en cáncer esofágico y nasofaríngeo (32, 34). El ratón deficiente de ADAMTS9 muere antes de la gastrulación pero el ratón heterócigo ADAMTS-9 +/- desarrolla espontáneamente neovascularización de la córnea. Se ha sugerido que esta enzima tiene un posible papel inhibitorio de la angiogénesis tumoral ya que los melanomas 6-F10 inducen mayor inducción vascular en los ratones ADAMTS-9 +/- que en los ratones silvestres (35)

#### ***1.5 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI): Características y Epidemiología***

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una enfermedad crónica y progresiva de origen desconocido que se caracteriza por daño y activación del epitelio alveolar, proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y un depósito exagerado de moléculas de matriz extracelular que trae como consecuencia la desorganización de la arquitectura del parénquima pulmonar y la pérdida del intercambio gaseoso(36-38).

La FPI es un padecimiento de mal pronóstico, no tiene un tratamiento efectivo y aproximadamente la mitad de los pacientes mueren de la enfermedad entre 2-3 años después de que aparecen los primeros síntomas que son una progresiva disnea (dificultad para respirar), volumen de los pulmones disminuido, y una histopatología de una neumonía Intersticial común. Está asociada al envejecimiento y en este contexto, su frecuencia se incrementa notablemente después de los 50 años; así mientras la prevalencia en individuos de 18-34 años es de 4 por cada 100,00 personas, ésta se incrementa a 227/1000 después de los 75 años (38-40)

### ***1.5.1 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI): Patogénesis***

Inicialmente, la FPI se describió como una enfermedad resultado de una respuesta inflamatoria crónica y persistente, provocando así una respuesta fibrótica. A esta vía inflamatoria pertenecen otras Neumonías Intersticiales del Pulmón, como lo es la fibrosis provocada por neumonitis por hipersensibilidad, enfermedad que presenta una respuesta inflamatoria típica (41)

Por otro lado, desde el 2001, Pardo y Selman, proponen que la FPI no representa un problema inflamatorio, sino que es el resultado de una lesión y activación aberrante de las células del epitelio alveolar y de una comunicación anormal entre éstas células epiteliales y los fibroblastos, que son finalmente los responsables de producir cantidades excesivas de moléculas de la matriz extracelular, en especial, las colágenas fibrilares, caracterizadas por contener una estructura de triple hélice que permite resistir el estiramiento y constituyen el cemento de las cicatrices fibróticas. Las células epiteliales no sólo sintetizan numerosos factores que favorecen el desarrollo de la fibrosis, además son capaces de transformarse en fibroblastos, mediante un complejo proceso embriológico conocido como transición epitelio-mesénquima. Este proceso biológico que es fundamental durante el desarrollo embrionario tiene consecuencias nefastas en la vida adulta ya que aumenta exageradamente el número de fibroblastos en el tejido donde ocurre. (42,46)

### ***1.5. 2 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA: Las células epiteliales activadas anormalmente, transición epitelio mesénquima claves probables de esta patología***

El daño inicial epitelial en Fibrosis Pulmonar Idiopática se encuentra asociado por factores potenciales que se han mencionados anteriormente, donde la reepitelización es un proceso deficiente, por células epiteliales cuboidales conocidas como

neumocitos tipo II, células metabólicamente activas, siendo su respuesta inicial el reclutamiento de diversas moléculas pro-fibrosantes y factores de crecimiento, como lo son TFG- $\beta$ , el TNF, endotelina 1, citocinas, metaloproteasas, factores tisulares mediadores de la coagulación, factores angiostáticos, algunas de estas moléculas que se encuentran involucradas en el proceso de reparación normal del tejido, donde la migración, proliferación de fibroblastos y su conversión a miofibroblastos, como consecuencia para la formación de cicatriz, sólo que en esta patología es aberrante la remodelación de la matriz extracelular(Figura 5)(43-44)

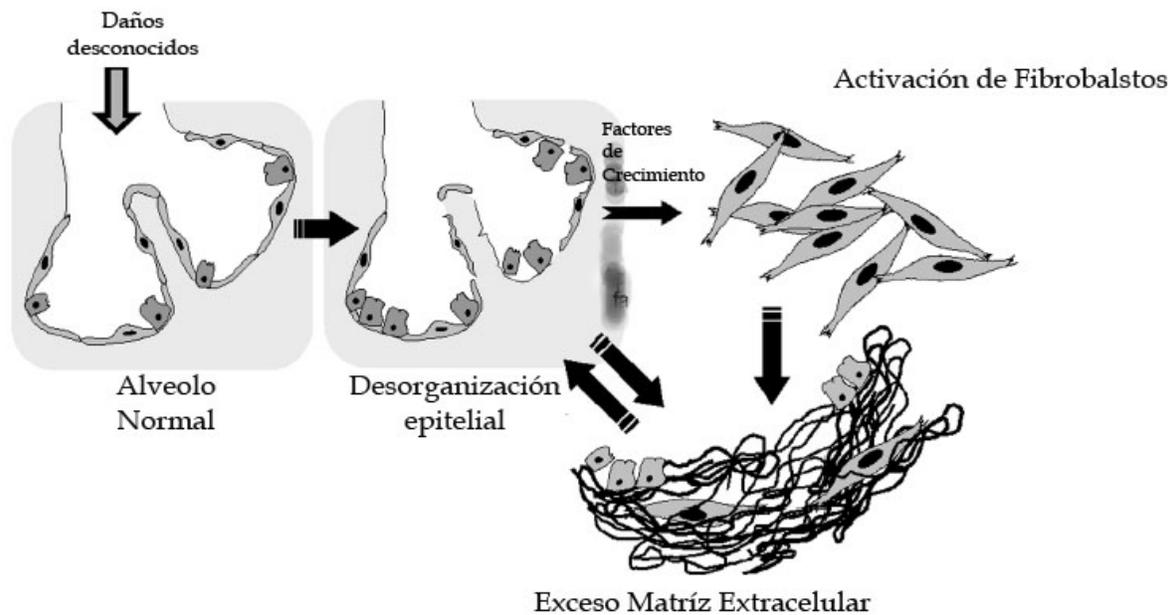


Figura5. Esquema del proceso fibrótico, esto por daño a las células epiteliales (Pardo A. & Selman M., 2001)

La Transición Epitelio-Mesénquima (TEM o EMT, por sus siglas en inglés) es un proceso por el cual las células epiteliales, por medio de varios procesos bioquímicos, adquieren fenotipo de células mesenquimatosas, implicando la capacidad migratoria, resistencia a la apoptosis, incremento de la producción de matriz extracelular y la evidente degradación de la membrana basal. En el 2007 y posteriormente en el 2008, se han propuesto que la TEM se puede clasificar en tres subtipos: el tipo 1, que es evidente durante el desarrollo embrionario, donde esta transición no provoca fibrosis ni células invasoras, por otro lado las células epiteliales de TEM tipo 2 están involucradas en procesos de reparación de tejidos dando como resultado la fibrosis característica posterior a un daño que si persiste la señalización se vuelve patológico; por último la TEM tipo 3 es caracterizada por los fenómenos observados en

neoplasias, que siendo resultado de cambios epigenéticos y genéticos favorables al desarrollo de tumores(Figura 6) (45).

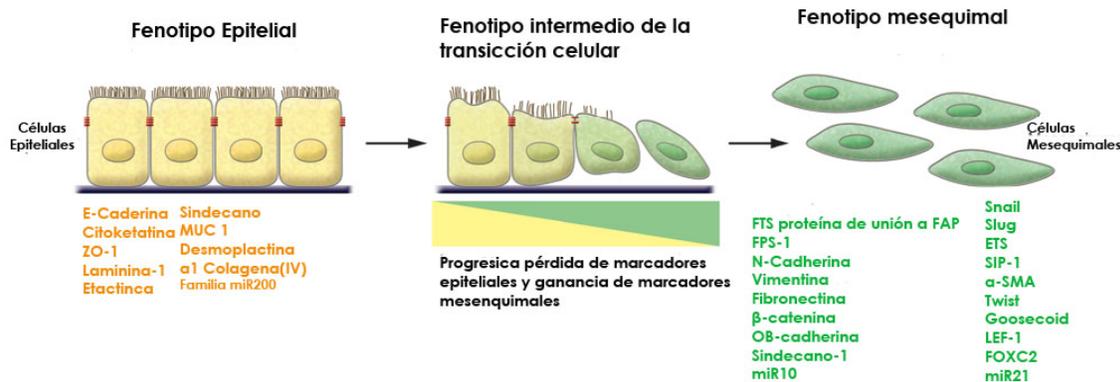


Figura 6 Fenotipos específicos para la transición epitelio mesenquima (TEM) (Kalluri R., 2009)

En Fibrosis Pulmonar Idiopática se ha propuesto que la TEM tiene un papel importante, la sobreexpresión de factores como el TGF- $\beta 3$  (Factor Transformante de Crecimiento, siglas en inglés), LEF-1(Factor Amplificador Linfoide) y Slug gen de la familia TGF- $\beta$ , aún se desconoce el mecanismo que inicia este fenómeno en la patología, sin embargo se han identificado varios factores que su inhibición o incremento se asocia a la TEM (46).

### 1.5.3 ADAMTS-9 Y FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

En un estudio realizado con microarreglos donde se analizó la expresión global de genes en FPI se encontró que la ADAMTS-9 estaba sobre expresada en comparación con pulmón normal, como se puede ver en la figura 7 (1)

Fig.

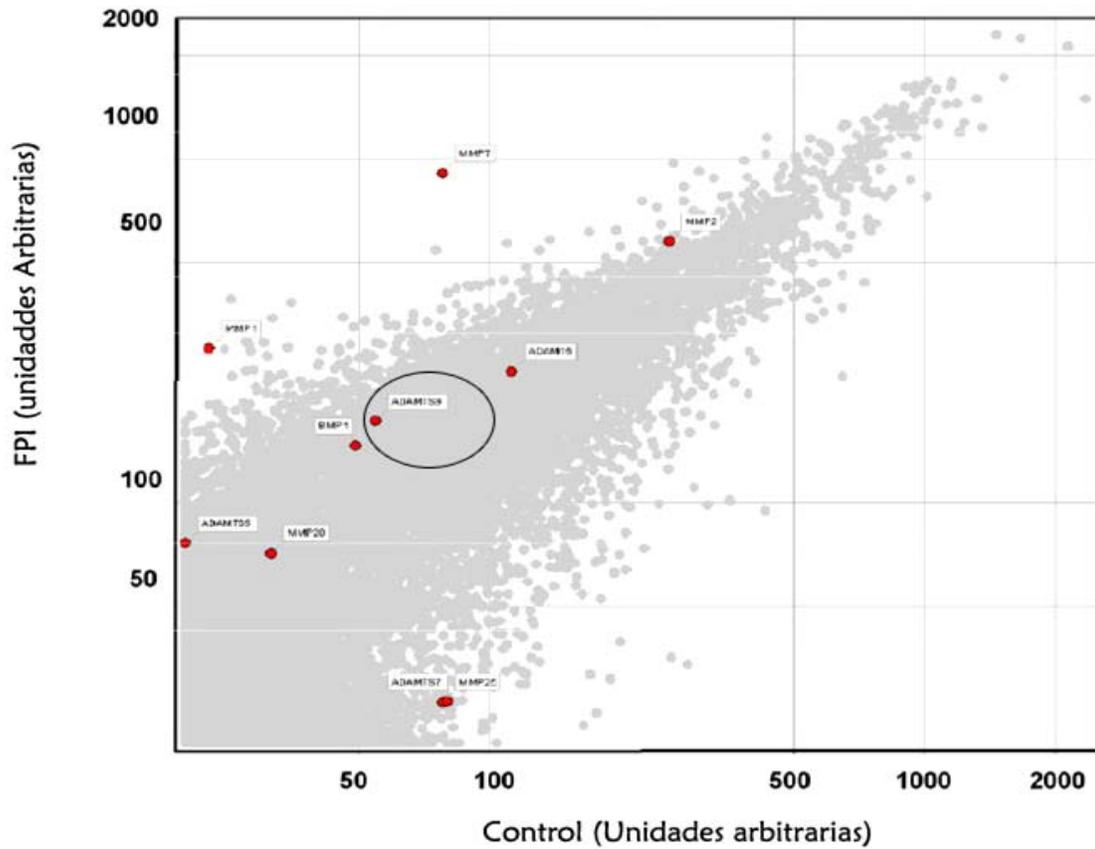


Figura 7. Miembros de la familia M10 y M12 significativamente sobreexpresadas en FPI entre otras se puede observar la presencia de la ADAMTS-9 (dentro del óvalo) (Pardo et al, 2007)

En este contexto el objetivo de esta tesis es corroborar por PCR en tiempo real la expresión de esta enzima y localizar por inmunohistoquímica su presencia en el pulmón fibrótico.

## 2. Objetivo

- Corroborar por PCR en tiempo Real la expresión de la ADAMTS-9 y localizar por inmunohistoquímica su presencia en pulmón fibrótico

### 3. Material y Métodos

#### 3.1 Datos de genómica

Los oligonucleótidos fueron diseñados con la herramienta del NCBI (National Center for Biotechnology Information) máximo de veinte pares de bases, abarcando de exón a exón, la opción elegida fue (46):

- 5' ACCCTGCCAAGGGGAACGGA 3'
- 3' GGGGCAGCCGATCGCATCTT 5'

Con un producto de 92 pares de bases, el oligo sentido, va del nucleótido 2708 al 2727 y codifica para la región espaciadora de la proteína al igual que el oligo antisentido, que va del nucleótido 2799 al 2780.

#### 3.2 Población de Estudio

Los cinco pacientes fueron diagnosticados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), conforme a lo establecido por la Asociación Americana del Tórax y la Sociedad Europa Respiratoria (ATS/ERS siglas en inglés). El diagnóstico se confirmó por medio de una biopsia quirúrgica. Las biopsias se utilizan con fines diagnósticos y para investigación con el consentimiento escrito de los pacientes. El comité ético de la institución aprobó este proyecto.

Las muestras de pulmón normal provienen de RNA de pulmón humano normal adquirido comercialmente de Ambion, Foster City, Ca; Origene, Rockville, MD; y Stratagene Santa Clara, CA.

### 3.3 *Inmunohistoquímica*

Los cortes histológicos de entre 3 y 5µm de grosor, embebidos en parafina y montados en portaobjetos son desparafinados en Xilol, hidratados gradualmente en una serie de diluciones descendentes de alcohol etílico y finalmente se sumergen en agua estéril. Con el fin de disminuir señal inesapécifica se bloquea la posible actividad de peroxidasa endógena con una solución de peróxido al 3% en metanol y finalmente las muestras se lavan con buffer de fosfatos. Las muestras también reciben un tratamiento de recuperación antigénica con buffer de citratos al 0.01M a pH6, calentándolo en horno de microondas, se enfría, la preparación, con agua corriente y se lava con buffer de fosfatos (PBS), el cual tiene un pH 7.4 y una concentración 0.01M el fosfato básico (NaHPO<sub>4</sub>) y 0.002M para el fosfato ácido (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Con el fin de bloquear antigenicidad inesapécifica las muestras se incuban en un bloqueador universal (Biogenex, San Ramón, CA) incubando durante 10 minutos lavado con buffer de fosfatos, y a continuación se incuba con suero de borrego (Chemicon, Billerica, MA) en una dilución de 1:100 con buffer de fosfatos durante 30 minutos. La inmunodetección inicia incubando con el anticuerpo primario contra la ADAMTS-9 (Triple Points Biologics, Forest Grove, OR) en una dilución 1:100 con undiluyente comercial y albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, después de templar las muestras a temperatura ambiente, se lavan con buffer de fosfatos y Tween al 1% dos veces, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a biotina (Super Sensitive Detection System, Biogenex Multilink) por 20 minutos a temperatura ambiente. Se continúa con un lavado con buffer de fosfatos salino (PBS) y Tween al 1%. Finalmente las muestras se incubaron con estreptavidina acoplada con peroxidase (Biogenex Multilink, San Ramón, CA) durante 20 minutos, seguido de un lavado con PBS-Tween, y se procedió a revelar la reacción con el compuesto Aminoetilcarbamida filtrado (Biogenex mutilink.) La reacción cromogénica se monitoreó con ayuda de un microscopio óptico deteniendo el precipitado del colorante con agua corriente. Las muestras son tratadas con una contratatinción de núcleos celulares con hematoxilina seguida de una inmersión en una solución de bicarbonato al 0.05M y un lavado adicional en agua corriente. Finalmente las preparaciones se cubren con resina hidrofílica y cubreobjetos de vidrio.

### 3.4 Extracción de RNA.

El RNA se extrajo mediante la técnica de TRIzol Reagent® (Invitrogen, Carlsbad CA) siguiendo indicaciones del fabricante, la homogenización del tejido con TRIzol® se utiliza 1ml por cada 50-100mg de tejido a lo que continua una incubación de 5 minutos en temperatura ambiente, posteriormente se adiciona 0.2ml de cloroformo por cada ml de TRIzol® incubándose tres minutos a temperatura ambiente, después de este tiempo se centrifuga a 12000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos a 4 °C, se recupera la fase acuosa, a la cual se agrega 0.5ml de isopropanol por cada ml de TRIzol® que se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, en cuanto se decanta el sobrenadante se le agrega 1 ml de alcohol al 75% por cada ml de TRIzol® el cuál se resuspende el botón y se procede a centrifugarlo a 7500rpm a 4°C durante 5 minutos pasado este tiempo y después de decantar el sobrenadante, se deja secar a temperatura ambiente ya seco el botón o pellet se resuspende en agua DEPC (dietilprocarbonato al 0.1%) de 10 a 15µl por cada ml de TRIzol®.

### 3.5 Reacción de la Transcriptasa Reversa

Las muestras de RNA se cuantificaron por espectrofometría a una absorbancia de 260nm obteniendo la concentración de RNA total directamente, a través de la fórmula (47):

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/ml} = (A_{260})(\text{Dilución})(40.0)$$

Donde:

- $A_{260}$ = Absorbancia ( en densidades ópticas) a 260nm
- Dilución= Factor de Dilución
- 40.0= Coeficiente promedio de extinción del RNA.

Después de calcular la concentración de RNA en cada una de las muestras, se calculó la cantidad necesaria para tener 1µg/µl, esto para agregar 1 µl de la DNAsa junto con 1µl de su buffer y diluirlos con 7µl de agua DEPC o libre de nucleasas por cada 1µg/µl de RNA, con el fin de eliminar cualquier residuo de DNA genómico en la muestra incubándose durante 30 minutos a 37°, y se para la reacción con 1µl, en cada muestra, de EDTA y se incuba a 60° durante 10 minutos.

Pasado el tiempo anterior se preparó la reacción de la transcriptasa reversa (BioRad), y obtener así cDNA, para ello cada muestra tendrá el volumen correspondiente de cada uno de los reactivos:

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Buffer 10x RT	2
dDNP's	0.8
Random Primers	2
Inhibidor de RNAsas	1
RetroTranscriptasa	1
Agua libre de nucleasas	2.2

Llevándose a un volumen total de 20 $\mu$ l de cada una de las muestras de RNA, que se someterán en el termociclador a las condiciones de:

<b>Temperatura(°C)</b>	<b>25</b>	<b>37</b>	<b>85</b>	<b>4</b>
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>10</b>	<b>120</b>	<b>0.05</b>	<b><math>\infty</math></b>

### 3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real

Los oligonucleótidos diseñados para la ADAMTS-9 fueron sintetizados y secuenciados en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo condiciones en termociclador fueron estandarizados:

	35 ciclos					
<b>Temperatura(°C)</b>	95	95	58	72	72	4
<b>Tiempo</b>	10 minutos	20 segundos	25 segundos	20 segundos	5 minutos	∞

Para hacer la curva estándar y comparar la expresión del gen, se obtiene el amplificado, para su posterior identificación por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, se recupera el mismo por medio del protocolo de QIAEXII de QIAGEN, que se basa en la disolución de la agarosa sin NaI sino por alta concentraciones de sales que rompen los puentes de hidrógeno de la agarosa a 50°C y un lavado adicional con el buffer para después recuperar el DNA mediante una resina de silica y posteriormente se disuelve en agua libre de nucleasas.

A continuación se cuantifica el DNA obtenido esto con el objetivo de calcular el número teórico de copias del gen amplificado, por medio del peso molecular de un par de bases que es de 622 daltones multiplicado por el tamaño del amplificado entre el número de moléculas:

**No. de copias**= (Peso Molecular de par de base) (tamaño de amplificado)/ (No. de avogadro)

Este resultado es divisor de la concentración calculada, resultado con el cual se obtendrá el volumen para obtener una dilución de  $10^{10}$  y posteriormente hacer diluciones de factor diez hasta llegar al factor  $10^1$  de copias del gen, siendo esto la curva estándar.

Para la reacción de la polimerasa, se utilizaron los siguientes criterios:

Reactivos	Volumen (μl)
MgCl 50mM	0.5
Buffer 10x	1.5
dNTP's 2mM	1.25
Oligo sentido 10μM	1.5
Oligo Antisentido 10μM	1.5
Sibergreen 10x	1.5
Floreseína	0.3
Taq®Platinum (5unidades/μl)	0.25
Agua	6.2

cDNA (1ng/μl)	2
Volumen total	15

Para la cuantificación del gen de la ADAMTS-9 se utilizó un termociclador BioRad iCycler iQ multicolor Real Time PCR Detection System, programada con las mismas características que el termociclador convencional.

En lo que se refiere al gen constitutivo, que en este caso se utilizó el gen ribosomal 18s, que será el control endógeno, se hizo el procedimiento similar que para el gen de la ADAMTS-9, entre las variaciones fueron las condiciones en termociclador:

		<b>35 ciclos</b>			
<b>Temperatura(°C)</b>	94	94	60	72	4
<b>Tiempo</b>	5 minutos	30 segundos	1 minuto	10 minutos	∞

La cuantificación se llevó a cabo con las variantes en reactivos:

Reactivos	Volumen (μl)
MgCl 50mM	0.5
Buffer 10x	1.5
dNTP's 2mM	1.25
Sonda Taqman®	1.5
Taq®Platinum (5 unidades/μl)	0.25
Agua	6.2
cDNA(dilución 1:100)	2
Volumen total	15

Donde con la Sonda Taqman (Applied Biosystems) se obtiene un producto de un tamaño de 187 pares de bases.

### 3.7 Análisis Estadístico

Para los resultados obtenidos en la PCR en tiempo real se expresan con media y desviación estándar. Las diferencias entre los grupos de muestras estudiados fueron

evaluadas con la prueba de T de Student utilizando el paquete INER stat, esto con un valor de p menor o igual al 0.05 ( $p \leq 0.05$ )

#### 4. Resultados

##### 4.1 Inmunohistoquímica de la ADAMTS-9

En preparaciones de tejido de pulmón normal, con FPI, se logró identificar la presencia de la ADAMTS-9 inmunoreactiva, utilizando un anticuerpo policlonal y mediante una reacciones cromogénica que produjo un precipitado rojo y los núcleos en azul, con hematoxilina.

Como se observa en la figura 6 que ejemplifican dos casos representativos de pulmones con FPI la ADAMTS-9 inmunorreactiva se localizó en células intersticiales, en el tejido en diferentes campos y las células presentaron una tinción intensamente positiva (Figura 6 A, B, C y D). En contraste, en pulmón normal no se detectó tinción positiva para la enzima (figura 6E).

Como control negativo se utilizó un caso con FPI, sin incubarlo con el anticuerpo primario. (Figura 6F)

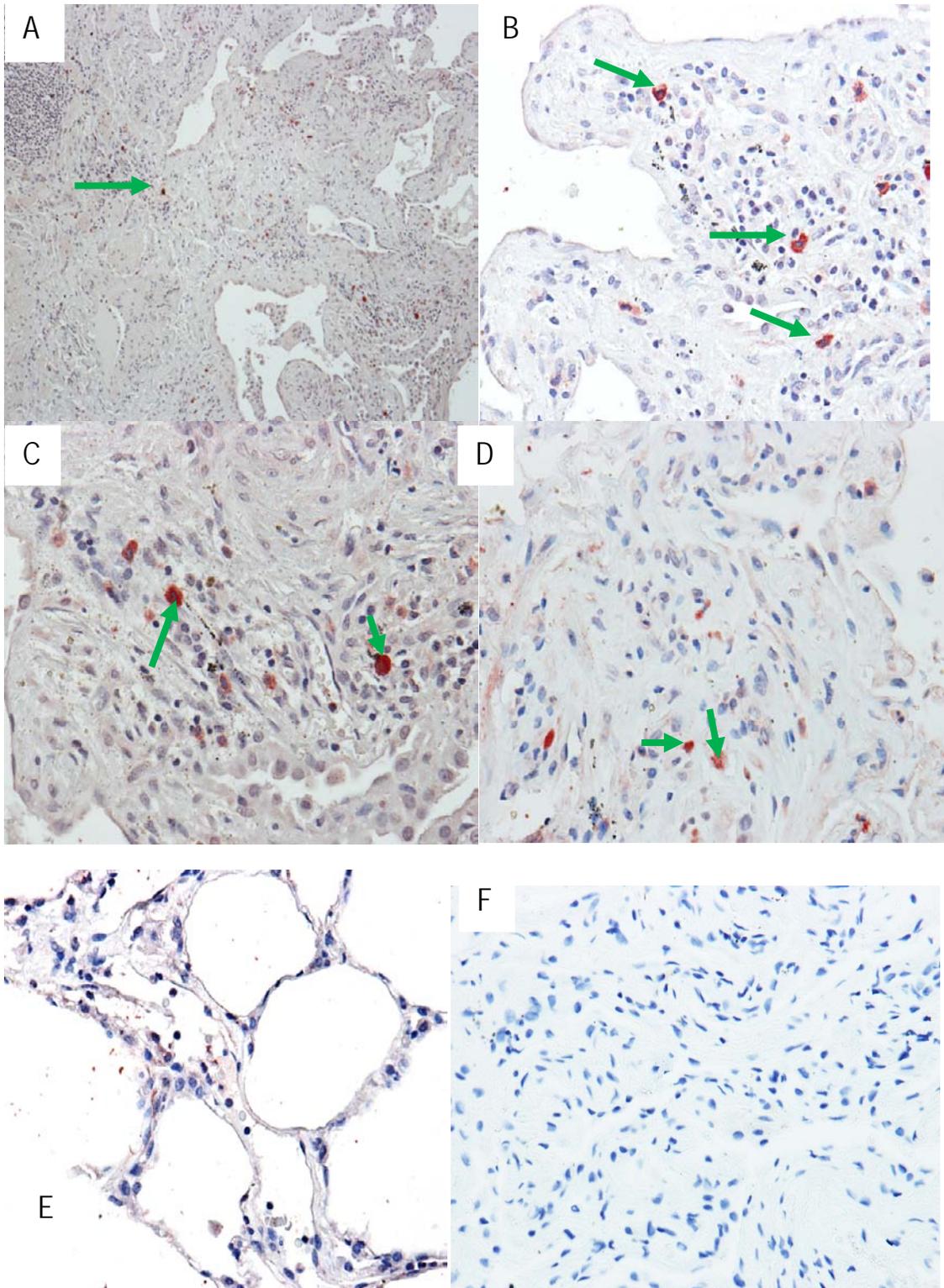


Fig. 6. Localización de la ADAMTS-9 en tejidos: Tinción intensa (reacción positiva) en células intersticiales en tejidos con FPI (Flecha verde) 10x(A) y 40x (B)(C)(D). Tejido de Pulmón Normal (E). Control Negativo (F)

#### 4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

El análisis por PCR en tiempo real del número de copias de ADAMTS-9 relativo a la expresión del RNA ribosomal 18S de muestras derivadas de cinco pacientes con FPI presenta un rango de 1.3 a 3.8 copias con un valor promedio de  $1.6 \pm 1.05$ . En este estudio se utilizaron 3 muestras de RNA comercial obtenido de pulmón humano normal. El resultado de PCR reveló que la ADAMTS-9 relativa al 18S rRNA presenta un rango de 5.9 a 14.6 copias con valor promedio de  $9.9 \pm 4.4$ . La comparación de estos valores no muestra significancia estadística ( $p= 0.08$ ).

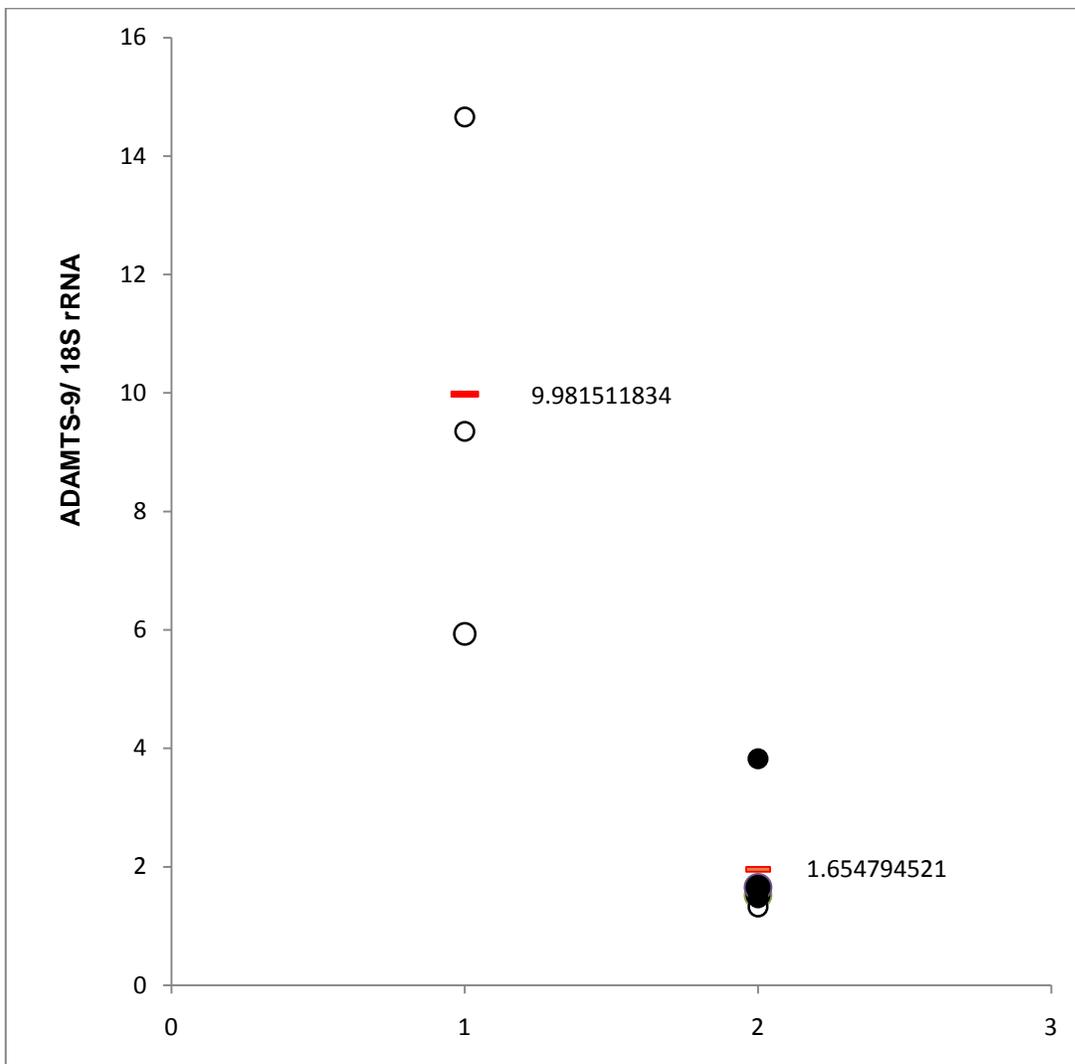


Figura 8 Expresión de la ADAMTS-9: gráfica de puntos, donde: los puntos blancos pertenecen a las muestras de pulmón normal, mientras que los puntos negros a las muestras con FPI, la barra roja representa la media para cada uno de los grupos evaluados.

## 5. *Discusión*

La fibrosis pulmonar idiopática forma parte de un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades respiratorias conocidas como enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID). La FPI, la más agresiva de este grupo de padecimientos, es una enfermedad crónica progresiva y letal, con un promedio de supervivencia de aproximadamente 3 años después del diagnóstico, y a la fecha no tiene ningún tratamiento que sea eficaz (36). La prevalencia de la FPI es de 20.2/100,000 en hombres y 13.2/100,000 en mujeres, y ocurre generalmente después de los 50 años de edad (39).

Se ha propuesto que la FPI representa un proceso fibrótico independiente de la inflamación que resulta de la lesión y activación aberrante de las células del epitelio alveolar y de una comunicación anormal entre estas células epiteliales y los fibroblastos, que son finalmente los que producen cantidades excesivas de moléculas de la matriz extracelular, en especial colágenas fibrilares, que se caracterizan por contener una estructura de triple hélice que permite resistir el estiramiento y que son el cemento de las cicatrices fibróticas. Las células epiteliales no solo sintetizan numerosos factores profibrosantes sino que además son capaces de transformarse en fibroblastos, mediante un complejo proceso embriológico conocido como "transición epitelio-mesénquima" caracterizada por el daño/activación del epitelio alveolo/bronquiolar, la proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y la exagerada acumulación de matriz extracelular lo que trae como consecuencia una extensa desorganización estructural del parénquima pulmonar donde las unidades alveolo-capilares responsables del intercambio gaseoso se pierden progresivamente y son reemplazadas por fibrosis y quistes (36).

Muchos de los mecanismos detrás de esta grave remodelación patológica involucran la expresión y regulación descoordinada de la familia de las MMPs, también llamadas matrixinas que consisten de 23 miembros en humanos (17). Existen numerosas evidencias de que algunas MMPs participan en la remodelación aberrante de la matriz extracelular en la fibrosis pulmonar en FPI y entre ellas destaca la sobreexpresión de la MMP-7, la MMP-1 y la MMP-2 y la MMP-9 (1,51).

La actividad de estas enzimas no solo involucra en la digestión de moléculas de la matriz extracelular sino que además, son capaces de procesar diversos factores de

crecimiento y citocinas. Es importante señalar que entre las múltiples proteínas que pueden ser blancos potenciales de las MMPs, algunas son profibrogénicas mientras que otras tienen una actividad anti-fibrogénica. En este contexto, las MMPs, desempeñan un papel esencial y complejo en varios procesos interrelacionados que suceden en la patogénesis de la FPI, incluyendo la remodelación de la MEC, la ruptura de las membranas basales, la apoptosis de las células epiteliales alveolares, la migración celular y la angiogénesis.

El uso de microarreglos de oligonucleótidos para analizar la expresión global de genes en FPI ha sido una herramienta útil que ha revelado que las MMPs anteriormente mencionadas se encuentran entre las moléculas más altamente expresadas en los pulmones de pacientes con FPI (41). Además de estas proteasas se encontró que la ADAMTS-5 y la ADAMTS-9 se encuentran sobre expresadas en este padecimiento.

La familia de las ADAMTS que significa por sus siglas en inglés (*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs*) metaloproteasas desintegrinas con motivos de trombospondina consisten de 19 proteasas. Estas enzimas desempeñan un papel importante en el desarrollo, angiogénesis y coagulación y su desregulación se ha implicado en enfermedades como cáncer, artritis y arterioesclerosis.

El hallazgo por microarreglos de que la ADAMTS-9 se encontraba sobreexpresada nos condujo a analizar por PCR en tiempo real la expresión de esta enzima en FPI, ya que es conveniente verificar por otros métodos además de los estudios de microarreglos dicha expresión.

En este estudio se utilizaron 5 muestras derivadas de FPI y se comparó su expresión usando como fuente de RNA de pulmón humano normal 3 muestras comerciales. Los resultados de este estudio utilizando PCR en tiempo real no mostraron diferencias significativas en la expresión de ADAMTS-9 entre FPI y pulmón normal. Por el contrario parecía haber una tendencia a una menor expresión de la enzima en FPI. Sin embargo, en el estudio de la presencia de la proteína por inmunohistoquímica la enzima inmunoreactiva se observó preferentemente en los tejidos de FPI y se localizó en células intersticiales, mientras que en el pulmón normal no se observó a la proteína.

Este resultado puede reflejar distintas posibilidades. Una de ellas está relacionada con la fuente de RNA de pulmón normal que es diferente en el estudio de microarreglos y en el presente trabajo. En la comparación por microarreglos las muestras control se obtuvieron por el mismo procedimiento y en el mismo laboratorio que las muestras de pulmón fibrótico. En este estudio, eran muestras de RNA obtenido de tres casas comerciales que mostraron ser muy heterogéneas en la expresión de la ADAMTS -9.

Por otro lado, aunque la inmunohistoquímica no es cuantitativa la presencia de la enzima en los pulmones patológicos y no en los normales sugiere que la ADAMTS-9 esta aumentada en FPI:

La ADAMTS-9 es una metaloproteasa secretada que se une a la superficie celular y que se ha reportado que degrada a los proteoglicanos versican y agregan. Existen muy pocos estudios relacionados con la expresión de la familia M12 en FPI.

Se ha demostrado que esta enzima está altamente expresada durante el desarrollo del ratón (31), y se identificó como un gen supresor de tumores ya que estaba completamente disminuida la expresión en la mayoría de las líneas de cáncer esofágico (32). Por otro lado, se ha mostrado en estudios in vitro que las células alveolares epiteliales expuestas a TGF- $\beta$  aumentan la síntesis de ADAMTS-9 lo que parece estar relacionado con la síntesis de colágena. (52)

Se requieren más estudios para aclarar la posible participación de esta enzima en la fibrosis pulmonar idiopática.

### **Bibliografía:**

1. Pardo, A., Selman, M. & Kaminski, N. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1141-1155 (Junio).
2. Lopez-Otin, C. & Overall, C.M. Protease degradomics: A new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 509-519 (2002).
3. López-Otín, C. & Bond, J.S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 30433 -30437 (2008).
4. The Mammalian Degradome Database. en <<http://degradome.uniovi.es/>>
5. MEROPS - the Peptidase Database. en <<http://merops.sanger.ac.uk/>>
6. Mansfeld, J. Metalloproteases. *Industrial Enzymes* 221-242 (2007).en <[http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-5377-0\\_14](http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_14)>
7. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* **69**, 562 -573 (2006).
8. Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L. & Edwards, D.R. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* **386**, 15-27 (2005).
9. Apte, S.S. A Disintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 31493 -31497 (2009).
10. Tang, B.L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**, 33-44 (2001).
11. Jones, G. & Riley, G. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Research & Therapy* **7**, 160-169 (2005).
12. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y.J., Yee, A.J. & Yang, B.B. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* **12**, 19-32 (2002).
13. Huang, K. & Wu, L.D. Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. *J. Int. Med. Res* **36**, 1149-1160 (2008).

14. Stanton, H., Rogerson F. M., East C. J., Golub S. B., Lawler K. E., Meeker C. T., Little C. B., Last K., Frammer P. J., Cambel I. E., Fourie A. K., & Fosang A. J. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* **434**, 648-652 (2005).
15. Nagase, H. & Kashiwagi, M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* **5**, 94-103 (2003).
16. Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1531-1546 (2003).
17. Canty, E.G. & Kadler, K.E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* **118**, 1341-1353 (2005).
18. Chauhan, A.K., Kisocka J., Brill A, Wlasko M. T., Scheifflinger F. & Wagner D.D. ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 2065-2074 (2008).
19. Rick, M.E., Austin, H., Leitman, S.F., Krizek, D.M. & Aronson, D.L. Clinical usefulness of a functional assay for the von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS 13) and its inhibitor in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Hematol* **75**, 96-100 (2004).
20. Shindo, T. et al. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.* **105**, 1345-1352 (2000).
21. Iruela-Arispe, M.L., Carpizo, D. & Luque, A. ADAMTS1: A Matrix Metalloprotease with Angioinhibitory Properties. *Annals of the New York Academy of Sciences* **995**, 183-190 (2003).
22. Richards, J.S., Hernandez-Gonzalez I., Gonzalez-Robayana I., Teuling E., Boerboom D., Falender A. E., Doyle K. H., LeBaron R. G., Thompson V. & Sandy J. D. Regulated expression of ADAMTS family members in follicles and cumulus oocyte complexes: evidence for specific and redundant patterns during ovulation. *Biol. Reprod* **72**, 1241-1255 (2005).

23. Regulated Expression of ADAMTS Family Members in Follicles and Cumulus Oocyte Complexes: Evidence for Specific and Redundant Patterns During Ovulation. (2005).en <<http://www.biolreprod.org/content/72/5/1241.full>>
24. Clark, M.E. Kelner G.S., Turbeville L.A., Boyer A, Arden K. C. & Maki R. A. ADAMTS9, a Novel Member of the ADAM-TS/ Metallospodin Gene Family. *Genomics* **67**, 343-350 (2000).
25. Somerville, R.P.T., Longpre J.M., Junger K. A., Engle J. M., Ross M., EvankoS., Wight T. N.,Leduc R. & Apte S.S. Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a Distinct ADAMTS Subfamily Related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 9503 -9513 (2003).
26. Koo, B.-H. et al. Cell-surface processing of pro-ADAMTS9 by furin. *J. Biol. Chem* **281**, 12485-12494 (2006).
27. Koo, B.-H., Longpré J.M., Somerville R. P. I., Alexander J. P., Leduc R. & Apte S.S. Regulation of ADAMTS9 Secretion and Enzymatic Activity by Its Propeptide. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 16146 -16154 (2007).
28. Zeng, W., Corcoran C., Collins-Racie L.A., LaVille E.R., Morris E. A. & Flannery C.R. Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: Comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1760**, 517-524 (2006).
29. Demircan, K., . ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* **52**, 1451-1460 (2005).
30. Yaykasli, K. et al. ADAMTS9 activation by interleukin 1 $\beta$  via NFATc1 in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **323**, 69-79 (2009).
31. Jungers, K.A., Le Goff, C., Somerville, R.P.T. & Apte, S.S. Adamts9 is widely expressed during mouse embryo development. *Gene Expression Patterns* **5**, 609-617 (2005).

32. Lo, P.H.Y., . Identification of a tumor suppressive critical region mapping to 3p14.2 in esophageal squamous cell carcinoma and studies of a candidate tumor suppressor gene, ADAMTS9. *Oncogene* **26**, 148-157 (2006).
33. Reid, M.J. et al. ADAMTS-9 expression is up-regulated following transient middle cerebral artery occlusion (tMCAo) in the rat. *Neuroscience Letters* **452**, 252-257 (2009).
34. Lung, H.L. et al. Characterization of a novel epigenetically-silenced, growth-suppressive gene, ADAMTS9, and its association with lymph node metastases in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **123**, 401-408 (2008).
35. Koo, B.-H. et al. ADAMTS9 Is a Cell-Autonomously Acting, Anti-Angiogenic Metalloprotease Expressed by Microvascular Endothelial Cells. *Am J Pathol* **176**, 1494-1504 (2010).
36. Selman, M., King, T.E. & Pardo, A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Annals of Internal Medicine* **134**, 136 -151 (2001).
37. Khalil, N. & O'Connor, R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment. *CMAJ* **171**, 153-160 (2004).
38. Selman, M. et al. Accelerated Variant of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical Behavior and Gene Expression Pattern. *PLoS ONE* **2**, e482 (2007).
39. Raghu, G., Weycker, D., Edelsberg, J., Bradford, W.Z. & Oster, G. Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 810-816 (2006).
40. Pardo, A. et al. Up-Regulation and Profibrotic Role of Osteopontin in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS Med* **2**, e251 (2005).
41. Selman, M. et al. Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 188-198 (2006).
42. Selman, M. & Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory Research* **3**, 3 (2002).

43. du Bois, R.M. Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 129-140 (2010).
44. Selman, M. & Pardo, A. Role of Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: From Innocent Targets to Serial Killers. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 364-372 (2006).
45. Kalluri, R. & Neilson, E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* **112**, 1776-1784 (2003).
46. Selman, M., Pardo, A. & Kaminski, N. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med* **5**, e62 (2008).
47. Primer designing tool. en <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)>
48. Farrell, J. RNA Isolation Strategies. *RNA Methodologies (4th Edition)* 45-80 (2010).en <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B9FC4-4Y59TX6-N/2/cadbb03afe09ed9f3151559ccce1eb87>>
49. Pardo, A. & Selman, M. Role of matrix metalloproteases in pulmonary fibrosis. *Matrix Metalloproteinases in Tissue Remodelling and Inflammation* 39-55-55 (2008).en <[http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7643-8585-9\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7643-8585-9_3)>
50. Selman, M. et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Pathogenesis and Therapeutic Approaches. *Drugs* **64**, (2004).
51. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc.* **3**:383-388 (2006).
52. Keating DT, Sadlier DM, Patricelli A, Smith SM, Walls D, Egan JJ, Doran PP. Microarray identifies ADAM family members as key responders to TGF-beta1 in alveolar epithelial cells. *Respir Res.* 2006 ;7:114