

29



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

## “EXPRESION DEL INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASAS TIPO 4 (TIMP-4) EN FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A :  
**MARIA SANDRA CABRERA BENITEZ**



DIR. DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO SEMO



296781



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



VERGAD NACIONAL  
AVENIDA 11  
MEXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
ente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo 4  
(TIMP-4) en Fibrosis Pulmonar Idiopática."

realizado por **Cabrera Benítez María Sandra**

con número de cuenta **09755359-3**, pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis **Dra. Annie Pardo Semo.**  
Propietario

Propietario **Dr. Moisés Selman Lama.**

Propietario **Dra. María de Lourdes Segura Valdez.**

Suplente M.en C. **María de los Remedios Josefina Ramírez Rangel.**

Suplente Biól. **Jorge Antonio García Alvarez.**

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de BIOLOGIA



Dra. Patricia Ramos Morán

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

Mamá,  
gracias por todo el amor que me has dado. Tu apoyo,  
comprensión y cariño son la fuerza que me ha  
ayudado a lograr mis objetivos.

Te admiro y quiero muchísimo.

## Agradecimientos

### **Dra. Annie Pardo:**

*Annie, eres una investigadora que admiro bastante. Gracias por confiar en mí, apoyarme y darme la oportunidad de formar parte de tu grupo de investigación.*

### **Dra. Lourdes Segura:**

*Lulú, gracias por el tiempo y conocimientos que me has brindado, tu paciencia me ayudo mucho para aprender las técnicas de hibridación in situ e inmunohistoquímica.*

### **M. en C. Remedios Ramírez:**

*Reme, gracias por las enseñanzas y el tiempo que invertiste conmigo, al igual que Lulú, representas parte fundamental en el desarrollo experimental de esta tesis.*

### **Dr. Moisés Selman:**

*Gracias por el apoyo brindado para la realización de esta tesis y por recibir a los estudiantes del laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias en el INER.*

### **Biólogo Jorge García:**

*Eres un gran amigo y compañero de trabajo, que bueno que has estado junto a mí para tranquilizarme en mis momentos de histeria y desesperación, gracias por los consejos y conocimientos que me has dado.*

### **Dr. Víctor Ruiz:**

*Gracias por los conocimientos compartidos, por tu ayuda para realizar la técnica de PCR, y por la paciencia y el valor que me has dado para trabajar con ratones.*

### **Carina, Pepe, Rocío (INER), Angélica, Don José Luis, Isabel, Dr. Alfonso (Bioquímica):**

*Gracias por crear un ambiente de amistad y compañerismo en el laboratorio.*

**Sra. Miriam Sasson:**

*Usted ha formado parte integral de mi vida, colaboró en gran medida para que mi infancia fuera grata. Nunca olvidaré todo el apoyo que hasta el día de hoy me ha brindado, gracias por su amistad.*

**Sra. María Benítez:**

*Tía, es una viejecita increíble, admiro su fortaleza, espero que todavía este con nosotros muchos años, gracias por la gran ayuda que representa para mí y para mi mamá.*

**Sr. Leoncio Benítez:**

*Tío, gracias por apoyarme y darme consejos tan valiosos.*

**Ivonne Lara, Judith Mendoza, Arturo Frappé, Lourdes Esparza, Rocío Romero:**

*Gracias por su amistad, he tenido experiencias muy gratas y divertidas con ustedes. Ricardo Cano, gracias por colaborar en el trabajo escrito de esta tesis.*

***Gracias a mi universidad, la UNAM,  
que me ha dado todo lo necesario para mi formación académica,  
es un honor y orgullo formar parte de ella.***

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México y en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), bajo la dirección de la Dra. Annie Pardo Semo.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN**

Matriz extracelular (MEC)	1
Componentes de la matriz extracelular	2
Metabolismo de la matriz extracelular, metaloproteinasas de matriz (MMPs)	4
Estructura de las MMPs	8
Regulación de la actividad de las MMPs	9
Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs)	10
Características de TIMP-4	12
Importancia de las MMPs y TIMPs en la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)	13

**OBJETIVOS** 17

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Población de estudio	18
1. Obtención de ribosondas	18
1.1 Descripción del plásmido	18
1.2 Transformación bacteriana	19
1.3 Purificación del plásmido	20
1.4 Marcaje del RNA con digoxigenina por transcripción <i>in vitro</i>	21
1.5 Precipitación del RNA con etanol	23
2. Hibridación <i>in situ</i>	23
3. Inmunohistoquímica	25
4. Reacción en cadena de la polimerasa	27

## Índice

---

4.1 Extracción de RNA	27
4.2 Transcripción inversa	28
4.3 PCR	29

### **RESULTADOS**

Transformación bacteriana y amplificación del plásmido	30
Localización del mRNA de TIMP-4 por hibridación <i>in situ</i>	31
Localización del inhibidor por inmunohistoquímica	33
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35

### **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES** 36

### **BIBLIOGRAFÍA** 40

### **ANEXO** 50

## *Lista de abreviaturas*

---

aa	Aminoácido
EGF	Factor de crecimiento epidermal
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
TGF	Factor de crecimiento transformante
aFGF	Factor ácido de crecimiento de fibroblastos
IL	Interleucina
TNF	Factor de necrosis tumoral
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
IFN	Interferón
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
kb	Kilobase
pb	Pares de bases
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PBS	Buffer de fosfatos salino
SSC	Buffer de citrato de sodio salino

## RESUMEN

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar intersticial difusa, de etiología desconocida, caracterizada por la proliferación de fibroblastos y acumulación excesiva de moléculas de matriz extracelular en el parénquima pulmonar, principalmente colágenas fibrilares. En este contexto la enfermedad refleja un desequilibrio entre la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular, donde están involucrados las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs).

El objetivo principal de este trabajo fue analizar la expresión del *Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas tipo 4 (TIMP-4)* en tejido pulmonar de pacientes con FPI. Por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, se observó que TIMP-4 es expresado principalmente por células plasmáticas, macrófagos y células epitelio-alveolares en los pulmones fibróticos, mientras que los experimentos realizados en pulmón normal resultaron negativos. Por PCR se observó que TIMP-4 se expresa en los pulmones fibróticos, mientras que en pulmón normal no se detectó resultado positivo.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y en conjunto con estudios realizados simultáneamente, en los cuales se analizó la expresión de TIMP-1, 2 y 3, y de las colagenasas 1, 2 y 3 en Fibrosis Pulmonar Idiopática (64, 71), se puede concluir que existe una elevada expresión intersticial de los 4 inhibidores en comparación con la expresión de colagenasas.

El papel que desempeña TIMP-4 en el desarrollo de la Fibrosis Pulmonar Idiopática se desconoce, sin embargo, debido a que se encuentra altamente expresado en los pulmones fibróticos por 3 tipos celulares diferentes, es probable que TIMP-4 participe activamente como inhibidor favoreciendo la estabilidad y depósito de las fibras de colágena, contribuyendo así en el remodelaje inapropiado de la matriz extracelular.

### **Matriz extracelular (MEC).**

Los tejidos no están formados únicamente por células, un porcentaje considerable de su volumen lo constituye el espacio extracelular, el cual está ocupado por una compleja red macromolecular (denominada matriz extracelular) a la cual las células se adhieren, ya sea a través de receptores específicos o por medio de ligandos. En diferentes órganos y tejidos existen variaciones en la composición y organización de los diferentes tipos de macromoléculas de la matriz extracelular lo que contribuye a determinar las propiedades de cada tejido en particular; por ejemplo en la piel, cartílago, tendón y hueso es un componente muy abundante mientras que en el cerebro y médula espinal es más escaso (1, 2, 4).

La matriz extracelular es importante para el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares, pero además también desempeña un papel complejo y activo en la regulación del comportamiento de las células que se encuentran en contacto con ella, afectando su desarrollo, migración, diferenciación, proliferación, forma y funciones metabólicas. Las conexiones de la matriz extracelular con las células a través de sus receptores (integrinas) determina la organización del citoesqueleto y la localización y activación de moléculas de señalización que guían funciones celulares tejido-específicas únicas (1, 2, 3).

### **Componentes de la matriz extracelular.**

La MEC está constituida por una gran variedad de moléculas y su composición estructural básica comprende, entre otras, a las colágenas que son las responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, la elastina

que le confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad, y los proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad (1, 4).

### *Colágena.*

Es el componente estructural más abundante de la MEC, la colágena es una molécula homo o heterotrimérica, cuyas subunidades, las cadenas  $\alpha$ , son productos de genes distintos, algunos de los cuales están sujetos a un *splicing* alternativo. Hasta ahora han sido clonadas y secuenciadas 34 cadenas  $\alpha$  diferentes. En una colágena fibrilar clásica más del 95% de su estructura secundaria es de triple hélice. Este tipo de estructura helicoidal es posible porque cada tercer aminoácido lo ocupa la glicina, el aminoácido más pequeño, y por lo tanto cabe en el centro de la superhélice. La estructura primaria de la colágena es repetitiva, teniendo la secuencia de aminoácidos Gly-X-Y, donde 30 % de las posiciones X y Y están ocupadas por prolina e hidroxiprolina respectivamente, estos aminoácidos le confieren estabilidad y rigidez a la molécula (1,2, 5, 8).

Los diferentes tipos de colágena (I- XIX) tienen funciones y organización diversas, incluyendo la formación de fibrillas, microfibrillas y membranas basales. Las colágenas tipo **I, II, III, V** y **XI** constituyen la clase de colágenas fibrilares (1).

Las colágenas tipo **IX, XII, y XIV** participan en la formación de fibras junto con las colágenas fibrilares, sin embargo no son capaces de formar agregados supramoleculares y no forman fibras por sí mismas. A esta clase de moléculas se les ha llamado colágenas asociadas a fibras con interrupción en triple hélices (FACIT: Fibril- Associated Collagens with Interrupted Triple helices) (1).

Las colágenas tipo **IV, VIII** y **X** que forman láminas se encuentran en membranas basales (1,2).

En el pulmón las colágenas tipo I y III se encuentran en el intersticio pulmonar, en las paredes de las vías aéreas y en los vasos sanguíneos, y junto con la colágena tipo II, que se localiza en el cartílago bronquial, constituyen el 95% de la colágena del pulmón. La colágena tipo IV se encuentra en membranas basales que separan el epitelio del intersticio y a éste del endotelio (1,2).

### *Glucosaminoglucanos.*

Están constituidos por largas cadenas de polisacáridos no ramificadas, compuestos de unidades repetidas de disacáridos, se distinguen cuatro grupos principales (2, 4):

- a) ácido hialurónico
- b) condroitín sulfato y dermatán sulfato
- c) heparán y heparina
- d) queratán sulfato.

### *Proteoglucanos.*

Están compuestos por largas cadenas de glucosaminoglucanos unidas covalentemente a una proteína central. Los proteoglucanos se clasifican principalmente en dos grupos (2, 4):

- a) Proteoglucanos pequeños ricos en leucina (decorina, biglucano, fibromodulina, lumican).
- b) Proteoglucanos modulares con sitios de unión para ácido hialurónico o lectinas (perlecán, agrecán, versicán).

### *Proteínas no colagénicas.*

El principal componente de las fibras elásticas es la elastina, rica en prolina y glicina, pero a diferencia de la colágena, presenta un bajo contenido de hidroxiprolina y carece de hidroxilisina. Las moléculas de elastina son secretadas al espacio extracelular, donde forman filamentos y láminas, y crean numerosos puentes cruzados, dando lugar a una extensa red (2).

Una de las glicoproteínas que contribuye a la adhesión de la célula a la matriz extracelular es la fibronectina. La fibronectina es un dímero compuesto por 2 subunidades unidas entre sí mediante enlaces disulfuro situados cerca del extremo carboxilo terminal. La tenascina, también es una glucoproteína adhesiva extracelular pero presenta una distribución más reducida que la fibronectina y es más abundante en los tejidos embrionarios (5).

La laminina es el principal componente de las laminas basales, junto con la colágena tipo IV, esta proteína está formada por la asociación de tres polipéptidos genéticamente distintos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (3, 6, 7, 10).

### **Equilibrio de la matriz extracelular, metaloproteinasas de matriz.**

El equilibrio de la MEC en diferentes condiciones fisiológicas es una consecuencia del balance entre la síntesis y degradación de los componentes de la misma. En contraste, un desequilibrio en el metabolismo de la MEC ha sido asociado con diferentes procesos patológicos. Numerosas evidencias sugieren que las metaloproteinasas de matriz (MMPs del inglés *matrix metalloproteinases*) son las enzimas responsables de la degradación de las macromoléculas de la matriz extracelular (12, 14, 15).

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que comparten varias características funcionales incluyendo:

- a) La habilidad para degradar por lo menos un componente de la matriz extracelular.
- b) La activación extra o intra celular de las proenzimas, ya que son sintetizadas como zimógenos.
- c) La inhibición de su actividad por inhibidores específicos de las MMPs, TIMPs ( del inglés *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*).

Las MMPs han sido clasificadas en varias subfamilias diferentes (tabla 1), esta clasificación se ha basado en la especificidad por el substrato y en características estructurales de los dominios (esquema 1), (10, 11, 13):

**Colagenasas:** Este subgrupo reúne a 3 distintos miembros: La colagenasa-1 (MMP-1) expresada en un gran número de células, preferentemente fibroblastos y macrófagos, la colagenasa-2 sintetizada principalmente por neutrofilos (MMP-8), y la colagenasa-3 (MMP-13) derivada originalmente de carcinoma de mama y que es expresada por una gran variedad de células. Estas enzimas degradan preferentemente colágenas fibrilares tipos I, II, y III (10, 11, 13).

**Gelatinasas:** La gelatinasa A ó colagenasa tipo IV de 72 kDa (MMP-2) y la gelatinasa B de 92 kDa (MMP-9) degradan predominantemente colágena tipo IV y V, elastina. Estas enzimas reciben el nombre de gelatinasas por su habilidad de degradar gelatina (colágena desnaturalizada), (10, 11, 13).

**Estromelisinias:** Las estromelisinias 1, y 2 (MMP-3, MMP-10). Estas enzimas actúan principalmente sobre fibronectina, laminina, y colágena tipo IV (10, 11, 13).

**Matrilisinias:** Este subgrupo reúne a proteasas que contienen solo los tres dominios necesarios para la secreción, latencia y actividad catalítica. Está representado por la matrilisina (MMP-7) y la recién clonada matrilisina-2 (MMP-26), (10, 11, 13).

**MMP tipo membrana (MT-MMP):** Estas proteínas tienen un dominio de membrana y una pequeña cola citoplásmica y adicionalmente tienen un motivo furina. Comprende 6 miembros diferentes, la MT1-MMP (MMP-14), MT2- MMP (MMP-15), MT3-MP (MMP-16) y MT4- MMP (MMP-17), MT5- MMP (MMP-24), y MT6- MMP (MMP-25) Son capaces de activar otras MMPs como la MMP-2, MMP-13, y pueden degradar numerosas proteínas de la matriz extracelular (10, 11, 13).

**Otras:** Reúne a un grupo de enzimas cuyas propiedades estructurales o funcionales no les permite clasificarse en los subgrupos mencionados con anterioridad como por ejemplo la metaloelastasa de macrófagos (MMP-12) la estromelisina- 3 (MMP-11), y la MMP-19 (10, 11, 13).

**Tabla 1.** Clasificación de la familia de las metaloproteinasas.

<b>Subfamilia</b>	<b>MMP</b>	<b>Nombre</b>
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa 1 o colagenasa intersticial
	MMP-8	Colagenasa 2 o colagenasa e neutrófilo
	MMP-13	Colagenasa 3
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A o colagenasa tipo IV de 72 kDa
	MMP-9	Gelatinasa B o colagenasa tipo IV de 92 kDa
Matrilisinas	MMP-7	Matrilisina 1 o PUMP1
	MMP-26	Endometasa o matrilisina 2
Estromelisinias	MMP-3	Estromelisinina 1
	MMP-10	Estromelisinina 2
	MMP-11	Estromelisinina 3
MMPs 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
<i>Otras</i>	MMP-12	Metaloelastasa de macrófago
	MMP-19	
	MMP-20	
	MMP-23	Enamelisina
	MMP-27	
	MMP-28	Epilisina

## Estructura de las MMPs.

La cadena polipeptídica de estas enzimas empieza con una **secuencia líder** hidrofóbica en el amino-terminal (N-terminal), la cual dirige la proteína a la vía secretoria. Esta secuencia líder, que es eliminada antes de la secreción está seguida por un propéptido. El **propéptido** (de ~ 80 aa) tiene una secuencia conservada **PRCG(V/N)PD**, la cisteína que se encuentra dentro de esta secuencia forma un enlace coordinado con el zinc presente en el sitio catalítico manteniendo la latencia de las MMPs. La remoción del propéptido por proteólisis resulta en la activación del zimógeno (12 - 15).

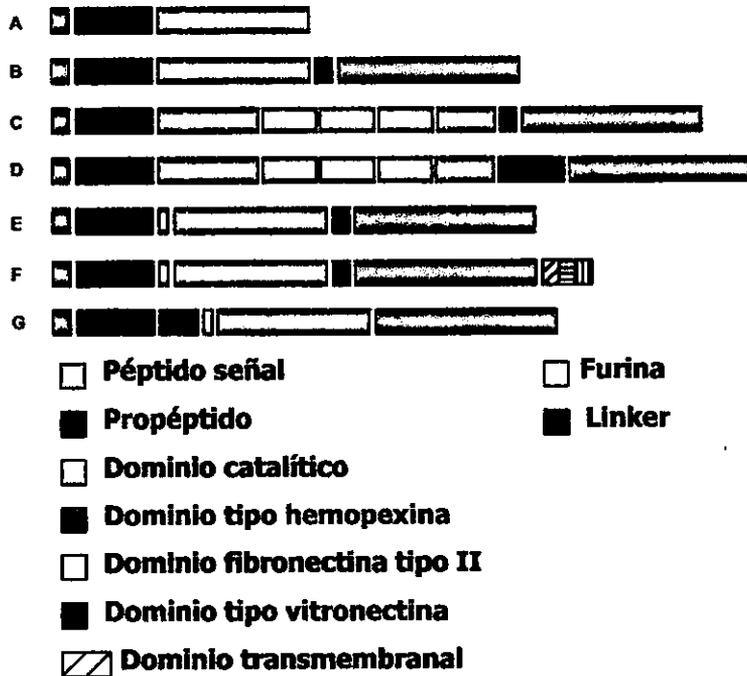
El **dominio catalítico** (de ~ 170 aa) contiene un ion de zinc el cual está unido a 3 residuos de histidina que se encuentran dentro de la secuencia conservada **HExxHxxGxxH**. El dominio catalítico tiene un ion de zinc estructural adicional y de 2 a 3 iones de calcio los cuales son requeridos para la estabilidad y la expresión de actividad enzimática (12 - 15).

En el carboxilo terminal se encuentra el **dominio tipo hemopexina** (de ~ 210 aa), denominado así por su homología con la proteína plasmática hemopexina (este dominio no lo presentan las matrilisinas). El dominio tipo hemopexina es requerido para la actividad de triple helicasa, tiene una forma de disco elipsoidal con una estructura de hélice con cuatro aletas. Una secuencia de aproximadamente 5 a 50 aminoácidos rica en prolina une al dominio hemopexina con el dominio catalítico. Ha sido mostrado que el dominio hemopexina juega un papel funcional en la unión al sustrato y en interacciones con los TIMPs (12 - 15).

En suma a estos dominios básicos, la familia de las MMPs involucra diferentes dominios estructurales y funcionales. Por ejemplo la MMP-2 y la MMP-9, conocidas como gelatinasas, incorporan 3 módulos homólogos al módulo tipo II de la fibronectina en el dominio catalítico, éstos se encuentran

involucrados con el sitio de unión a gelatina (colágena desnaturalizada). Un **dominio transmembranal** (de ~ 25 aa) es encontrado en las MT-MMPs, este dominio hidrofóbico ancla a estas enzimas en la membrana plasmática (13,15, 67).

**Esquema 1.** Dominios de las metaloproteinasas.



Tomado de Nagase H y Woessner, 1999.

### Regulación de la actividad de las MMPS.

La actividad de las MMPs es regulada a varios niveles intra y extracelulares incluyendo transcripción, secreción, activación e inhibición. Una de las características más notables de las metaloproteinasas es que su expresión puede ser regulada transcripcionalmente por factores de crecimiento (EGF, bFGF, PDGF, TGF $\alpha$ , aFGF, TGF $\beta$ , IGF-I), citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , IL-4, IFN $\gamma$ ) y hormonas (progesterona) (11,16,17,33).

No solo factores solubles, sino también interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular son claves en la expresión génica de muchas

metaloproteinasas; estas interacciones ocurren a través de receptores de la célula, integrinas, que son capaces de transmitir señales intracelulares que conducen a la expresión de genes particulares (11, 13, 14).

Las MMPs funcionan principalmente en la superficie celular o en el espacio extracelular y sus actividades están controladas a través de la activación del zimógeno e inhibición por inhibidores endógenos,  $\alpha$ 2-macroglobulina y TIMPs (14, 15,35).

### **Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs).**

La familia de los TIMPs comprende cuatro miembros: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Los TIMPs desempeñan un papel muy importante en el control de la actividad de las metaloproteinasas y por lo tanto, en el balance entre la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular. Aunque la actividad principal de los TIMPs es inhibir MMPs activas, estos inhibidores tienen otras propiedades entre las que se incluyen el ser moduladores de la proliferación, promotores del crecimiento celular, inhibidores de la angiogénesis, apoptosis, etc. (28, 29, 40, 56, 60).

TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-4 están presentes en una forma soluble, mientras que TIMP-3 se une a componentes de la matriz extracelular. Los TIMPs forman complejos no covalentes con las MMPs inactivándolas de manera irreversible; los TIMPs no sólo se unen al sitio activo de las MMPs, sino también a otros dominios participando en su activación (37, 40).

Los cuatro miembros de la familia de los TIMPs comparten varias características estructurales:

- a) Tiene 12 residuos de cisteína altamente conservados, los cuales forman 6 puentes disulfuro que son esenciales para su conformación nativa.
- b) El dominio amino-terminal está altamente conservado, en este dominio se encuentra una secuencia consenso, **VIRAK**.
- c) Un propéptido señal de aproximadamente 29 aminoácidos que es removido para producir la proteína madura.

**Tabla 1.** Localización cromosómica y tamaño de los 4 miembros de la familia TIMP.

TIMP	Localización cromosómica	mRNA (kb)	Proteína (kDa)
TIMP-1	Xp11.23, Xp11.4	0.9	28.5
TIMP-2	17q23, 17q25	3.5, 1.0	21
TIMP-3	22q12, 22q13	5.0, 2.6, 2.4	21
TIMP-4	3p25	1.4	22

Los TIMPs contienen regiones únicas que distinguen a cada miembro de los otros. Aunque los diferentes TIMPs se unen a la mayoría de las MMPs, existen diferencias en su afinidad por éstas, en sus propiedades inhibitorias y en los tipos de complejos no inhibitorios que ellos forman, mediante su dominio carboxilo-terminal. Así, TIMP-2 se une con gran afinidad al zimógeno de la MMP-2 (proMMP-2) formando un complejo que es importante en la activación de la gelatinasa. A en la superficie celular, mientras TIMP-1 forma un complejo específico con la proMMP-9, activando a la gelatinasa B (40, 54, 60, 62).

TIMP-1 es una proteína glucosilada con un pI 8.0, la proteína no glucosilada tiene un peso molecular de 20 kDa y tiene 2 sitios de unión a carbohidratos. El gen de TIMP-1 humano es altamente inducible a nivel

transcripcional en respuesta a muchas citocinas, factores de crecimiento y hormonas (27, 40, 60).

TIMP-2 es una proteína no glucosilada, con un pI 6.45 . El gen TIMP-2 humano es expresado constitutivamente en muchos tejidos y se ha postulado que se encuentra cerca del gene Sinapsina IV en el cromosoma 17q23-25 (40, 60).

TIMP-3 es una proteína no glucosilada la cual fue originalmente purificada de fibroblastos de pollo y se identificó como CHIMP-3. El gen TIMP-3 humano se encuentra dentro del intrón V del gen Sinapsina III en el cromosoma 22q12-13 (40, 52, 64).

#### **Características del TIMP-4.**

TIMP-4 es una proteína no glucosilada de 224 aminoácidos incluyendo al propéptido señal de 29 aminoácidos, es la proteína más neutra (dentro de los cuatro TIMPs humanos) en condiciones fisiológicas, con un pI 7.34. Como los otros TIMPs, TIMP-4 expresa actividad inhibitoria, uniéndose a la MMP-2, -3, -1, -7 y -9 activas (41, 44). TIMP-4 se asocia con la MT1-MMP activa, inhibiendo su proceso autocatalítico, sin embargo, el complejo MT1-MMP/TIMP-4 no actúa como receptor para la proMMP-2. Al igual que TIMP-2, TIMP-4 se une al dominio carboxilo terminal de la proMMP-2, sin embargo, no participa en su activación (57, 68, 70).

Greene, et al, han sugerido que la expresión de TIMP-4 parece limitada, encontrando un nivel de expresión alto en corazón, niveles bajos de expresión en riñón, páncreas, colon y testículos, sin detectar transcritos en hígado, cerebro, pulmón, intestino, timo, y bazo. En base a lo anterior se ha sugerido una expresión tejido específica para TIMP-4 (41).

Recientemente se ha demostrado que TIMP-4 tiene propiedad anti-proliferativa y anti-invasiva en corazón; bajos niveles de expresión de TIMP-4 han sido asociados con diferentes cardiopatías (69).

Los TIMPs humanos tienen una estructura intron-exon conservada. La proteína TIMP-4 está codificada por 5 exones, el tamaño del gen es de aproximadamente 6 kb. Se ha especulado que el gen TIMP-4 humano podría localizarse en el intron V del gen Sinapsina II en el cromosoma 3p25. El tamaño de los exones es similar en todos los TIMPs y los sitios de corte y empalme están conservados. Por el contrario, el tamaño de los intrones varía en los diferentes genes de la familia TIMP, TIMP-4 es pequeño mientras TIMP-2 y TIMP-3 son considerablemente más grandes ya que tienen intrones más grandes. TIMP-4 muestra 37% de homología con TIMP-1, 72% con TIMP-2 y 51% con TIMP-3 (51-53, 58).

### **Importancia de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs) en la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) .**

La matriz extracelular juega un papel esencial que determina la integridad estructural y funcional del pulmón bajo condiciones normales y/o después de algún daño. Un desequilibrio entre la síntesis y degradación de los componentes de la MEC en el cual están involucradas tanto las enzimas responsables de la síntesis de las moléculas de la MEC como las MMPs y los TIMPs, parece ser de central importancia en la patogénesis de la fibrosis pulmonar (45- 48).

En términos generales, la fibrosis pulmonar se caracteriza por la proliferación de fibroblastos y la acumulación de matriz extracelular, principalmente, de colágenas fibrilares en el parénquima pulmonar (bronquiolos

respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares, alvéolos e intersticio), (48, 72).

Bajo el término de neumopatías intersticiales difusas (también denominadas enfermedades pulmonares intersticiales difusas o enfermedades fibrosantes del pulmón) se agrupa un gran número de padecimientos respiratorios que se caracterizan por comprometer difusamente al parénquima pulmonar, afectando primordialmente al intersticio (espacio comprendido entre la membrana basal del capilar y la membrana basal del epitelio alveolar) y a los espacios alveolares (72).

Las enfermedades fibrosantes del pulmón generalmente comparten una serie de eventos, que contribuyen al desarrollo de fibrosis pulmonar y entre los cuales se incluye:

- a) Daño inicial
- b) Inflamación
- c) Fibroproliferación
- d) Acumulación anormal de colágenas

En general, después del daño pulmonar se producen cambios patológicos que son rápidamente reparados, permitiendo al pulmón regresar a su condición normal. Si el daño es severo o repetitivo o si ocurre en un individuo susceptible, la lesión puede evolucionar a fibrosis pulmonar (72).

En particular la **Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)** es una enfermedad de causa desconocida, generalmente progresiva, crónica e irreversible que presenta una expectativa de vida promedio menor a 5 años, es considerada una de las neumopatías intersticiales difusas (NID) más agresiva y frecuente. La fibrosis pulmonar idiopática probablemente no se trata de una

enfermedad única, sino que puede ser el resultado patológico común de diferentes agentes causales desconocidos. Esta enfermedad conduce a la destrucción de las unidades alveolo-capilares, responsables del intercambio gaseoso, provocando insuficiencia respiratoria en los individuos que la padecen (72).

Aunque los mecanismos patogénicos en FPI aún no se han determinado, la hipótesis que ha prevalecido sugiere que la fibrosis es precedida y provocada por un proceso crónico inflamatorio que daña al pulmón y modula la fibrogénesis, sin embargo hay evidencias que sugieren que la inflamación no juega un papel central (71).

Recientemente Selman, *et al.*, (71) han propuesto que la FPI no es una enfermedad inflamatoria y que el daño epitelial en ausencia de alveolitis es suficiente para estimular el desarrollo de fibrosis. Esta enfermedad representa un proceso de reparación anormal en el pulmón, que es caracterizado por la migración y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos y por una actividad incrementada de citocinas fibrogénicas (TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , PDGF e ILGF) (71).

La ausencia de una apropiada reepitelialización y un inapropiado remodelaje de la MEC (incluyendo rompimiento de la membrana basal, angiogénesis y fibrosis) podrían explicar el proceso anormal de reparación (72). Un aspecto importante del desarrollo de la fibrosis es el metabolismo alterado de varios componentes de la matriz extracelular. El incremento en el contenido de colágena puede ser resultado de un aumento en la síntesis, un decremento en la degradación o la suma de ambos procesos (73).

La actividad colagenolítica disminuida probablemente está relacionada a niveles bajos de expresión y síntesis de colagenasas intersticiales o con una sobreexpresión de TIMPs. Pardo y su grupo de investigación han encontrado

que la razón molar TIMP-1/colagenasa es mayor en fibroblastos derivados de pulmones fibróticos que en los que provienen de pulmones normales (64, 73).

Se ha observado que la actividad inhibitoria de los TIMPs es significativamente mayor en el parénquima pulmonar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, TIMP-1 y -2 se encuentran incrementados en áreas de fibrosis densa; TIMP-1 se localiza en células intersticiales asociadas a tejido fibrótico, TIMP-2 se encuentra en miofibroblastos entre focos de fibroblastos. Estos antecedentes indican que la participación de estos inhibidores en la patogénesis de la enfermedad es importante (64, 71, 73).

Una hipótesis de trabajo de nuestro grupo ha sugerido que en la FPI la presencia de los inhibidores de metaloproteinasas desempeña un papel preponderante en la patogénesis de dicha enfermedad. Dentro de este contexto, en este trabajo se analizó por primera vez la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo 4 (TIMP-4) tanto en tejido pulmonar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática como en tejido pulmonar normal.

Este trabajo forma parte integral de un estudio en el que se analizó además de la expresión de los TIMPs -1, -2 y -3, la expresión de las colagenasas MMP-1, -8 y -13, y las gelatinasas A y B.

**OBJETIVO GENERAL.**

Analizar la expresión del gen *TIMP-4* en Fibrosis Pulmonar Idiopática.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Localizar por hibridación *in situ* el mRNA para *TIMP-4* en tejido pulmonar normal y fibrótico.

Determinar la localización celular de la proteína *TIMP-4* en tejido pulmonar normal y fibrótico por inmunohistoquímica.

Analizar la expresión del gen *TIMP-4* por PCR en en tejido pulmonar normal y fibrótico.

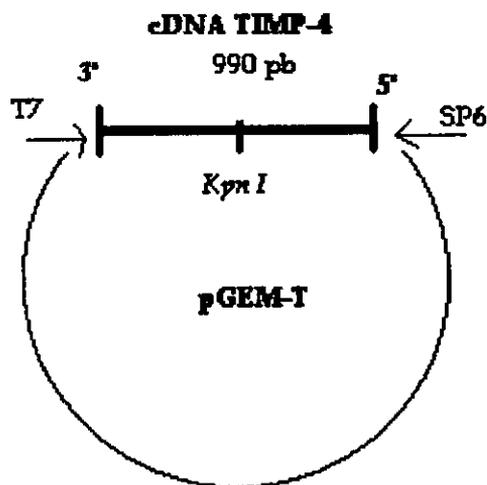
## Población de estudio.

Los tejidos utilizados para analizar la expresión del TIMP-4 fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). El tejido pulmonar fibrótico se obtuvo de biopsias de pacientes a los cuales se les diagnosticó fibrosis pulmonar idiopática, el diagnóstico fue basado en estudios clínicos, radiológicos, tomográficos e histológicos. El tejido pulmonar histológicamente normal se obtuvo de necropsias de individuos adultos no fumadores, cuya causa de muerte no estuvo relacionada con una patología pulmonar.

### 1. Obtención de ribosondas.

#### 1.1 Descripción del plásmido.

Esquema 2. Plásmido pGEMhT4.



El plásmido contiene promotores para la T7 y SP6 RNA polimerasas DNA-dependientes flanqueando a la región de clonación múltiple, ésta contiene sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Nco I* (extremo 3') y *Sal I* (extremo 5').

## **1.2 Transformación bacteriana.**

El cDNA de TIMP-4 humano fue clonado en el vector pGEM-T (Promega Corp.), el cual fue donado por Suneel Apte (Cleveland Clinic Foundation). Este plásmido, denominado pGEMhT4, fue utilizado para transformación bacteriana.

Se utilizó el método de choque térmico y  $\text{CaCl}_2$  (74) para obtener células competentes, usando la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*.

Protocolo:

1. Se cultivó una colonia de *E.coli* (cepa DH5 $\alpha$ ) en 30 ml de medio LB (Luria Bertani, ver anexo) pH 7.4 a 37°C durante 24 hr en agitación constante.
2. Al término de la incubación se cultivaron 400 $\mu\text{l}$  en 19.6 ml de medio LB y se incubó durante 2-3 hr a 37°C en agitación constante, tiempo en el cual se alcanzó la fase exponencial de crecimiento de las bacterias a transformar ( $5 \times 10^7$  células/ml, D.O. 0.4-0.6 a 600 nm).
3. La muestra se enfrió en hielo por 5 minutos y posteriormente se centrifugó 10 minutos a 1875 x g (Beckman TJ-6R) a 4°C.
4. El pellet bacterial obtenido se resuspendió en 10 ml de  $\text{CaCl}_2$  (50 mM) frío y se incubó 5 minutos en hielo.
5. La muestra se centrifugó utilizando las mismas condiciones que en el paso 3.
6. El pellet fue resuspendido en 1/15 respecto al volumen original en  $\text{CaCl}_2$  (50 mM) frío y se incubó en hielo durante 10 minutos.
7. A una muestra de 200 $\mu\text{l}$  obtenida del paso 6 se le adicionó 1ng del plásmido pGEMhT4 disuelto en 100 $\mu\text{l}$  de Tris (10mM pH 7.4).
8. Se incubó la muestra en hielo durante 25 minutos y posteriormente las células fueron sometidas al choque térmico a 42 °C durante 2 minutos.

9. La muestra fue cultivada en 3 ml de medio LB por 1 hr a 37°C sin agitación.
10. Al término de la incubación se centrifugó la muestra a 1875 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
11. El pellet obtenido fue resuspendido con el líquido residual del tubo y se utilizó para cultivar en cajas de Petri con LB agar y ampicilina (50µg/ml).
12. Se seleccionaron al azar algunas de las colonias resistentes a ampicilina, se cultivó en 20 ml de medio LB en presencia de ampicilina (50µg/ml) y se incubó a 37°C toda la noche.

Se tomaron 3 ml del cultivo y se centrifugaron para obtener el pellet bacterial y posteriormente se procedió a purificar el plásmido, con objeto de comprobar si las bacterias contenían el plásmido pGEMhT4 y para amplificarlo.

### ***1.3 Purificación del plásmido.***

Para purificar el plásmido pGEMhT4 se utilizó un kit comercial (QIAGEN) basado en el método de lisis bajo condiciones alcalinas (74) seguido por la unión del DNA plasmídico a una resina de intercambio aniónico (QIAGEN-tip

El método consiste en resuspender el pellet bacterial en una solución que contiene RNAsa A, seguido de lisis con NaOH y SDS, la reacción de lisis se detiene adicionando acetato de potasio. El método de lisis alcalina causa que el DNA cromosomal de la bacteria se desnaturalice, sin embargo, el DNA plasmídico, cerrado covalentemente, no se desnaturaliza.

El DNA plasmídico se adhiere a la columna ya que la resina se encuentra cargada positivamente. Posteriormente el DNA plasmídico fue eluido

de la columna, precipitado con isopropanol y lavado con etanol al 70 %, finalmente el DNA plasmídico fue resuspendido en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

El plásmido pGEMhT4 fue sometido a digestión con enzimas de restricción para analizar si el tamaño del inserto (cDNA TIMP-4) y el plásmido (pGEM-T 3003 pb) correspondían a lo esperado. Para liberar el inserto (cDNA de TIMP-4 humano) se utilizaron las enzimas de restricción *Nco I* (GIBCO BRL) que reconoce la secuencia 5'-C↓ CATG G-3' en la posición 37 y la enzima *Sal I* (GIBCO BRL) que reconoce la secuencia 5'-G↓ TCGA C-3' en la posición 75 del plásmido pGEM-T . La cantidad de enzima usada para la digestión se determinó considerando que 1 unidad de endonucleasa digiere 1 $\mu$ g de  $\lambda$  DNA a 37°C durante 1 hr. Una muestra de 2 $\mu$ l de la microdigestión se corrió en un gel de agarosa al 1% para analizar los tamaños del plásmido e inserto liberado.

El tamaño del inserto y del plásmido fueron verificados comparando con el marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/ *Hind III* (GIBCO BRL).

Se realizó una macrodigestión usando la enzima *Kpn I* que reconoce la secuencia 5'-G GTAC↓C-3' en la posición 683 del cDNA de TIMP4, para linearizar el plásmido y utilizarlo como templado para transcripción *in vitro* (1 $\mu$ g de DNA). Después de la digestión se empleó extracción fenol-cloroformo (v/2v) y precipitación con acetato de sodio (3M pH 5.0) y etanol (2v/v), para eliminar la enzima de restricción y sales minerales contenidas en el buffer de la enzima.

#### **1.4 Marcaje del RNA con digoxigenina por transcripción *in vitro*.**

El vector pGEM-T contiene promotores específicos para la SP6 y T7 RNA polimerasas y se encuentran flanqueando al sitio de clonación múltiple y por lo tanto al inserto. Para generar la ribosonda sentido (5'-3'), se utilizó la SP6 RNA

polimerasa (Boehringer Mannheim) ya que el promotor para esta polimerasa se encuentra adyacente al extremo 5' del inserto. Para generar la ribosonda antisentido (3'-5'), se utilizó la T7 RNA polimerasa (Boehringer Mannheim) ya que su promotor se encuentra en el extremo 3'.

Las ribosondas marcadas se obtuvieron utilizando el kit DIG-RNA labeling mix (Boehringer Mannheim), que está diseñado para su uso con las RNA polimerasas SP6 y T7, donde, aproximadamente cada 20 a 25 nucleótidos del transcrito, es incorporada UTP-digoxigenina por las enzimas mencionadas.

Protocolo de la reacción:

1. A un tubo de microcentrifuga se adicionó:
  - 1  $\mu$ g de DNA recombinante linearizado
  - 2  $\mu$ l de DIG-RNA labeling mix (10x)
  - 2  $\mu$ l de buffer de transcripción (10x)
  - 18  $\mu$ l de agua libre de RNAsas
  - 2  $\mu$ l de SP6 RNA polimerasa para la ribosonda sentido
  - 2  $\mu$ l de T7 RNA polimerasa para la ribosonda antisentido
2. Se mezcló y centrifugó brevemente. Se incubó durante 2 hr a 37°C.
3. Al término de la incubación se adicionaron 2  $\mu$ l de DNAasa I libre de RNAsa para remover el DNA templado, se incubó durante 15 minutos a 37°C.
4. Finalmente se agregó en hielo 2  $\mu$ l de EDTA 0.2M, pH 8.0 para detener la reacción de transcripción.

### **1.5 Precipitación del RNA con etanol.**

Después de detener la reacción de transcripción se realizó el siguiente protocolo:

1. Se adicionaron 2.5µl de LiCl 4M y 75µl de etanol (-20 °C) a la reacción, se mezcló y se incubó durante 3 hr a -20 °C.
2. Se centrifugó 15 minutos a 11 750 x g a 4 °C.
3. Se lavó el pellet con 50µl de etanol al 70% y se centrifugó como en el paso 2.
4. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20µl de agua estéril libre de RNAsas.

El RNA obtenido fue analizado en un gel de agarosa al 1%. Se realizó un dot-blot para cuantificar la incorporación de digoxigenina en la ribosonda utilizando varias diluciones y comparando con un control estandarizado del kit comercial DIG control Test strips (Boehringer Mannheim). Las ribosondas así como la solución de prehibridación, la cual es utilizada para bloquear uniones inespecíficas de la ribosonda (ver anexo), se calentaron a 65 °C durante 10 minutos antes de ser mezcladas para evitar la formación de doble cadena en la ribosonda.

### **2. Hibridación *in situ*.**

La hibridación *in situ* de ácidos nucleicos es el método más poderoso para localizar secuencias de DNA y RNA específicas en la célula. El método está basado en la hibridación molecular por complementariedad de bases y comprende básicamente el uso de un fragmento de RNA marcado *in vitro* (ribosonda), la cual se une a su cadena de mRNA complementaria.

Para localizar el mRNA de TIMP-4 se utilizó la ribosonda antisentido (sonda que tiene una secuencia complementaria al mRNA de TIMP-4) y como control negativo la ribosonda sentido (sonda que tiene la misma secuencia nucleotídica del mRNA). La hibridación *in situ* se realizó en cortes de tejido pulmonar normal y fibrótico de 4µm de grosor montados en laminillas, usando las ribosondas marcadas con digoxigenina. Para cada caso se utilizó un duplicado como control negativo.

Se realizó el siguiente procedimiento:

1) DESPARAFINACIÓN: Se incubaron las laminillas a 50 °C durante 5 minutos, después se incubaron en xilol por 10-15 minutos.

2) REHIDRATACIÓN: Los tejidos fueron sumergidos en soluciones graduales de etanol (100%, 95%, 50%) en agua libre de RNAsas (agua tratada con dietil-pirocarbonato) y finalmente se realizaron dos lavados en agua-DEPC, todos ellos durante 5 minutos.

3) ROMPIMIENTO DE RIBOSOMAS: Se incubaron las laminillas en HCl 0.2 N por 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron en agua estéril por 5 minutos.

4) DESPROTEINIZACIÓN: Se incubaron los tejidos con 1µg/ml de proteinasa K (GIBCO BRL) disuelta en Tris-HCl 0.05M pH 8.0 por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con agua-DEPC durante 10 minutos.

5) ACETILACIÓN: Las laminillas se incubaron en una solución de trietanolamina 0.1M pH 8.0 y anhídrido acético a una concentración final de 0.25% (v/v), durante 5 minutos en agitación constante. Posteriormente las laminillas fueron

lavadas durante 5 minutos en agua-DEPC y se aplicó a los tejidos una solución de equilibrio (ver anexo) durante 10 minutos.

6) PREHIBRIDACIÓN: Se incubaron las laminillas con la solución de prehibridación (ver anexo) durante 1hr a temperatura ambiente.

7) HIBRIDACIÓN: Se aplicó a los tejidos la solución de hibridación (ver anexo) que contiene la ribosonda marcada con digoxigenina y se incubó en cámara húmeda durante toda la noche a 42 °C.

8) LAVADOS: Los tejidos fueron lavados varias veces en SSC a diferentes concentraciones (2x, 1x, 0.5x) en agitación constante.

9) DETECCIÓN DEL HÍBRIDO mRNA-RIBOSONDA: Las laminillas se incubaron en Tris-HCl 100mM, NaCl pH 7.5 150 mM durante 1 minuto y posteriormente con una solución bloqueadora que contiene suero normal de borrego al 2% y tritón X-100 al 0.3% durante 30 minutos. Se aplicó el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Boeringer Mannheim) y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Al término de la incubación, los tejidos fueron lavados durante 10 minutos en Tris-HCl 100 mM, NaCl pH 7.5 150 mM.

10) APLICACIÓN DEL CROMÓGENO: Se incubaron los tejidos con el cromógeno Fast Red (Biomed) y fueron contrateñidos con hematoxilina de Mayer y montadas en medio de montaje acuoso.

### **3. Inmunohistoquímica.**

Para la localización de la proteína TIMP-4 se utilizó el anticuerpo policlonal anti-TIMP4 donado por S. S. Apte ( Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH). Como control negativo el anticuerpo primario (anti-TIMP4) fue

reemplazado por suero normal. El experimento fue desarrollado en cortes de tejido pulmonar normal y fibrótico de 4  $\mu\text{m}$  de grosor. Para cada caso se utilizó un duplicado como control negativo.

Se desarrolló el siguiente procedimiento:

- 1) Para desparafinar, se incubaron las laminillas a 50 °C durante 5 minutos, después fueron sumergidas en xilol varias veces durante 15 min.
- 2) Los tejidos fueron rehidratados en etanol 100%, 95%, 50%, 5 minutos en cada uno de ellos. Posteriormente se hicieron 4 lavados, 2 de ellos en agua estéril y 2 en PBS, cada uno de 5 min.
- 3) Se incubaron las laminillas en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos, para eliminar la peroxidasa endógena y se lavaron 2 veces durante 5 minutos en PBS.
- 4) Las laminillas fueron incubadas en buffer de citratos 0.01 M, pH 6.0 y posteriormente se hicieron 2 lavados con PBS.
- 5) Las laminillas se incubaron en cámaras húmedas con suero normal (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido 1:20 en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Después de quitar el suero normal, se aplicó el anticuerpo primario anti-TIMP4 (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a los tejidos utilizando una dilución 1:1000, se incubó a 4°C durante toda la noche. Los duplicados de cada caso, utilizados como controles negativos, no fueron incubados con el anticuerpo anti-TIMP4.

7) Al término de la incubación se hicieron 2 lavados en PBS de 5 minutos cada uno y se aplicó el anticuerpo secundario marcado con biotina, las laminillas se incubaron en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.

8) Se hicieron 2 lavados de 5 minutos en PBS.

9) Se aplicó el conjugado estreptavidina-peroxidasa (BioGenex, San Ramon, CA), las laminillas fueron incubadas en cámara húmeda durante 20 minutos a temperatura ambiente, después se hicieron 2 lavados en PBS.

10) Finalmente se aplicó como sustrato de la peroxidasa 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) en buffer de acetato conteniendo  $H_2O_2$  al 0.05%. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina de Mayer y montadas en un medio de montaje acuoso.

#### **4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

##### ***4.1 Extracción de RNA.***

Para extraer el RNA total del tejido pulmonar normal y fibrótico se utilizó el reactivo TRIZOL (Life Technologies), este reactivo es una solución de fenol e isotiocinato de guanidina. El método desarrollado esta basado en la técnica de extracción de RNA de Chomczynsky y Sacchi y es el siguiente:

1) HOMOGENIZACIÓN: Por cada 50 mg de tejido se agregó 1ml de TRIZOL y se homogenizó.

2) SEPARACIÓN DE LA FASE ACUOSA: Las muestras homogenizadas fueron incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIZOL y se agitaron las muestras por 2 minutos

para después incubarlas 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 8,160 x g a 4 °C por 15 minutos. Después de la centrifugación se recuperó la fase acuosa.

3) PRECIPITACIÓN DEL RNA: La fase acuosa recuperada se transfirió a un tubo nuevo, se adicionó isopropanol (0.5ml de isopropanol por cada ml de TRIZOL utilizado para la homogenización) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 8,160 x g a 4 °C por 10 minutos.

4) LAVADO DEL RNA: Se decantó el sobrenadante y se adicionó al pellet 1 ml de etanol al 75%. Se centrifugo nuevamente a 8,160 x g a 4 °C por 10 minutos y se decantó el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en agua-DEPC.

#### **4.2 Transcripción inversa.**

El RNA obtenido fue tratado con DNasa I y se utilizó el kit *Gene Amp RNA PCR* ( Perkin Elmer) para desarrollar la reacción de transcripción inversa y sintetizar cDNA (75). Se preparó un mezcla con un volumen final de 23 µl con la siguiente composición:

5mM	MgCl
1X	Buffer PCR II 10 X
1mM	DCTP
1mM	dATP
1mM	dGTP
1mM	dTTP
1U/µl	Inhibidor de RNAsas
2.5 U/µl	MuLV Transcriptasa reversa
2.5µM	Hexámeros al azar
-----	Agua con DEPC

A esta mezcla se le añadieron 2  $\mu$ l de la muestra experimental (RNA extraído de los tejidos). Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos, donde los hexámeros hibridan con el RNA templado, después inicia la reacción de polimerización por la transcriptasa reversa a una temperatura de 42 °C . Finalmente se desnaturaliza la enzima transcriptasa reversa a una temperatura de 99 °C (75).

### 4.3 PCR

La amplificación por PCR para TIMP-4 fue desarrollada utilizando una mezcla con un volumen de 25 $\mu$ l por reacción, conteniendo:

20 mM	Tris:HCl pH 8.3
50 mM	KCl
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
200 $\mu$ M	dNTP's
1 $\mu$ M	Primers específicos (5'-3' y 3'-5')
1 U	Taq Gold DNA polimerasa

Las muestras fueron estandarizadas utilizando la misma concentración de cDNA ( 5 pg/ $\mu$ l ) como se cuantificó por análisis de la amplificación del gen constitutivo GAPDH.

Los primers específicos para TIMP-4 (41, 44) fueron:

- A. 5' CCAGAGGTCAGGTGGTAA 3' (antisentido)
- B. 5' ACAGCCAGAAGCAGTATC 3' (sentido)

Los primers utilizados generan teóricamente un producto de 446 pb. Las condiciones de cada ciclo fueron:

95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C
10 min	30 seg	1 min	1 min	10 min

Para analizar el tamaño del producto amplificado se tomo una alícuota de cada caso a los 40 ciclos y se corrió en un gel de agarosa al 1.5 %.

### **Transformación bacteriana y amplificación del plásmido.**

Las ribosondas para hibridación *in situ* fueron generadas a partir del cDNA de TIMP-4 humano clonado en el vector pGEM-T, como se describió en material y métodos. Observamos que sólo las células de *E. Coli* que contienen el plásmido pGEMh-T4 fueron capaces de formar colonias cuando se plaquéó en agar el cual contenía ampicilina como agente de selección. Con objeto de corroborar el éxito de la transformación bacteriana y para amplificar el plásmido, se realizó una miniextracción, obteniendo 2 µg de DNA plasmídico.

Después de la digestión con las enzimas *Kpn I*, *Nco I* y *Sal I*, el DNA fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y los fragmentos obtenidos fueron visualizados en un transiluminador UV. Las enzimas *Nco I* y *Sal I* producen un fragmento de ~ 990 pb correspondiente al inserto (cDNA de TIMP-4) y otro de ~ 3003 pb correspondiente al vector pGEM-T (Fig.1). El valor estimado (pb) para cada una de las bandas corresponde al tamaño esperado teóricamente.

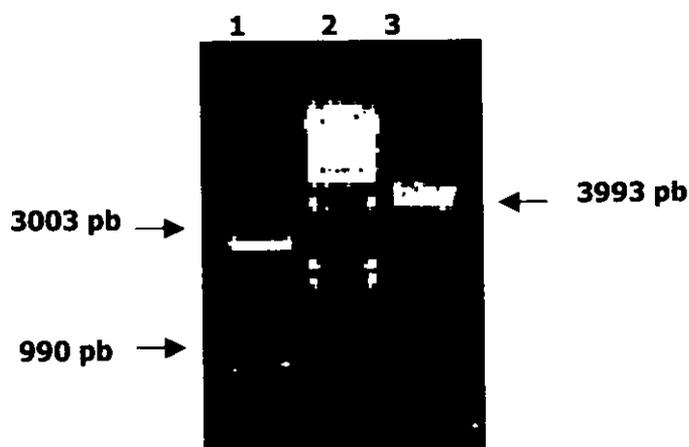


Fig.1 Electroforesis en gel de agarosa 1%. *Carril 1*: Vector pGEM-T e inserto liberado (cDNA TIMP-4). *Carril 2*: Marcador de peso molecular  $\lambda$ DNA/ *Hind III*. *Carril 3*: Plásmido pGEMh-T4 sin digerir.

En la Fig. 2 observamos una banda de  $\sim 3993$  pb que corresponde al plásmido pGEMhT4 (vector + cDNA TIMP-4) linearizado con la enzima *Kpn I*, el tamaño corresponde a lo esperado teóricamente. El tamaño en pb fue calculado comparando con el marcador de pesos moleculares  $\lambda$ DNA/ *Hind III*.



Fig.2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. *Carril 1*: Marcador de peso molecular  $\lambda$ DNA/ *Hind III*. *Carril 2*: Plásmido pGEMh-T4 sin digerir. *Carril 3*: Plásmido pGEMh-T4 linearizado con la enzima *Kpn I*.

El plásmido pGEMh-T4 linearizado con *Kpn I* fue utilizado como templado para transcripción *in vitro*, se obtuvieron la ribosonda sentido, de  $\sim 436$  bases, transcrita por la SP6 RNA polimerasa y la ribosonda antisentido de  $\sim 506$  bases transcrita por la T7 RNA polimerasa, ambas ribosondas con UTP-digoxigenina incorporada. Se obtuvieron  $\sim 400$  pg/ $\mu$ l de RNA marcado con digoxigenina en cada reacción en base al resultado del Dot-blot. El tamaño de las ribosondas corresponde a lo esperado teóricamente.

### ***Localización del mRNA de TIMP-4 por hibridación in situ.***

Las ribosondas generadas por transcripción *in vitro* fueron utilizadas para hibridación *in situ*. En los tejidos provenientes de fibrosis pulmonar idiopática, utilizando la ribosonda antisentido, se localizó el mRNA de TIMP-4

en células epiteliales (Fig. 3 A). En áreas intersticiales, se observa una intensa señal positiva en células plasmáticas y macrófagos intersticiales (Fig.3 B). En pulmón normal no se observa señal positiva utilizando la ribosonda antisentido (Fig.3 D). En los tejidos hibridados con la ribosonda sentido, utilizados como control negativo, no observamos señal positiva (Fig.3 C).

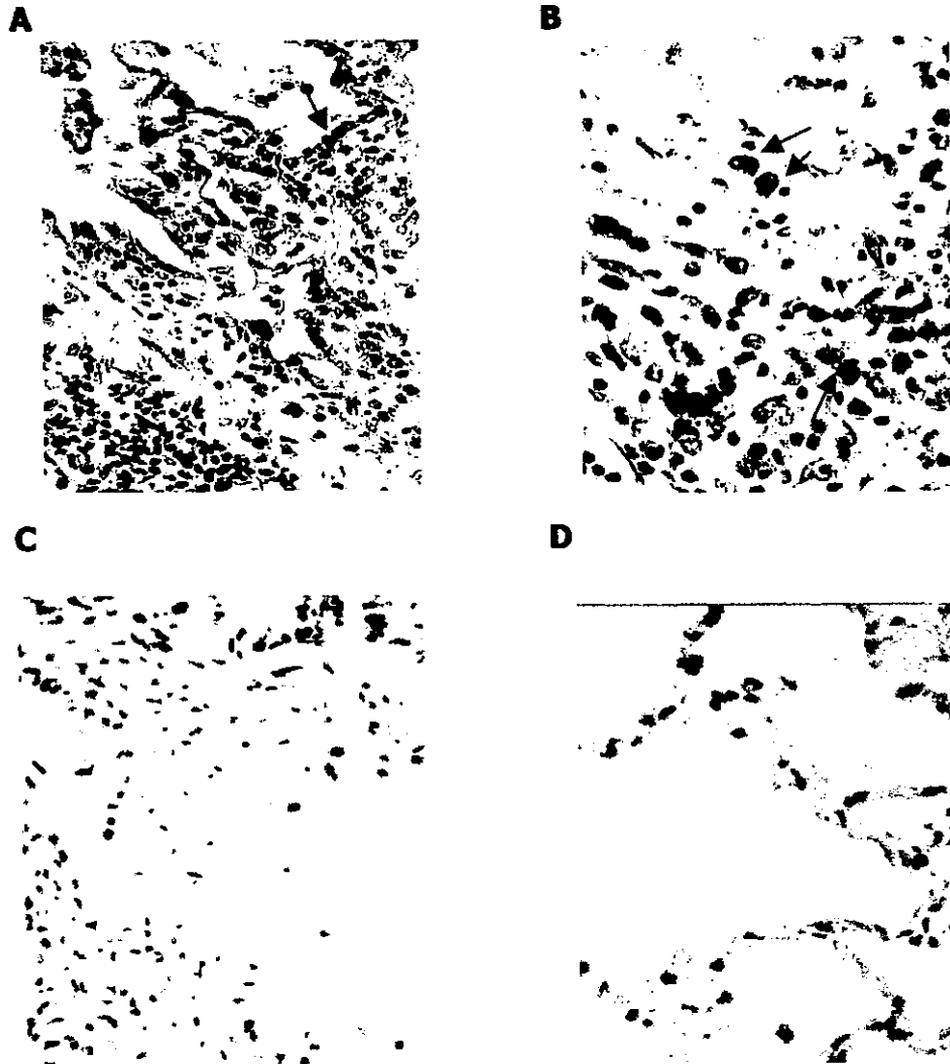


Fig.3 Hibridación *in situ* en tejido pulmonar normal y fibrótico. A y B : hibridación *in situ* utilizando la ribosonda antisentido, se observa señal positiva en células epiteliales (flecha en foto A), macrófagos intersticiales (flecha inferior en foto B) y células plasmáticas (flechas superiores en foto B) en tejido fibrótico. C: hibridación *in situ* utilizando la ribosonda sentido, no se observa señal positiva en el tejido fibrótico. D: En pulmón normal no se observa señal positiva utilizando la ribosonda antisentido (40x).

### ***Localización del inhibidor por inmunohistoquímica.***

Por inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo anti-TIMP-4, localizamos la proteína TIMP-4 en células epiteliales, macrófagos intersticiales y células plasmáticas en los tejidos provenientes de fibrosis pulmonar idiopática confirmando los resultados obtenidos por hibridación *in situ* (Fig. 4A) . Tanto para el pulmón normal como para los tejidos incubados sin el anticuerpo primario (anti-TIMP-4), no observamos señal positiva (Fig. 4B, C).

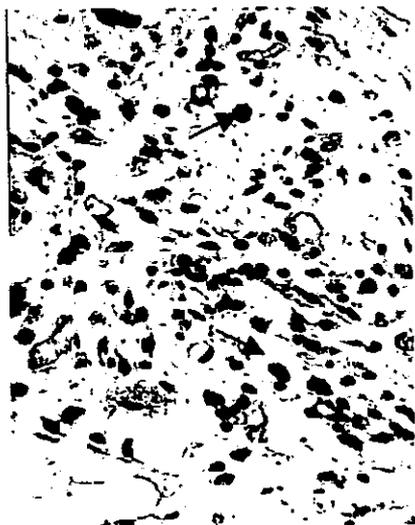
**A****B****C**

Fig. 4. Inmunohistoquímica en tejido pulmonar normal y fibrótico. *A*: utilizando el anticuerpo policlonal anti-TIMP-4, observamos señal positiva en células epiteliales, macrófagos intersticiales (*flecha superior*) y células plasmáticas (*flecha inferior*). *B*: no se observa señal positiva en los tejidos que fueron incubados sin el anticuerpo primario. *C*: no se observa señal positiva en pulmón normal.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Por *PCR*, después de 40 ciclos utilizando primers específicos para TIMP-4, se obtuvo un fragmento de 446 pb que corresponde al tamaño esperado, sólo en los pulmones fibróticos (Fig. 5 , carril F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>). En los pulmones normales (Fig.5, carril N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub>) no se obtuvo amplificación utilizando la misma concentración de cDNA y las mismas condiciones. También observamos que la reacción fue específica ya que no hubo amplificación de productos inespecíficos.

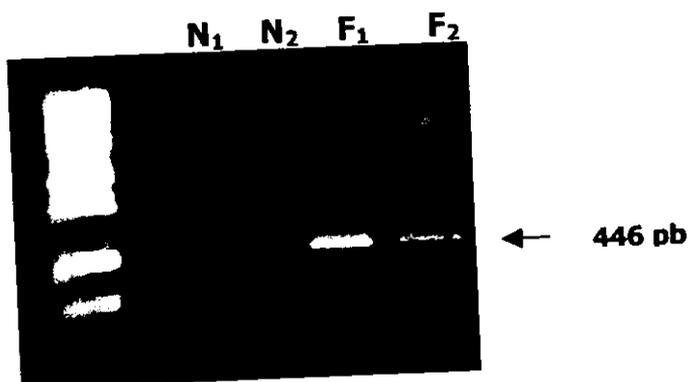


Fig.5 Análisis de expresión del gen TIMP-4 humano por RT-PCR. Carril N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> observamos que no hay producto de amplificación en tejido pulmonar normal. Carril F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>: observamos un producto de 446 pb en el tejido pulmonar fibrótico.

La matriz extracelular juega un papel esencial tanto estructural como fisiológico que determina la integridad del pulmón bajo condiciones normales y como parte de un proceso de reparación seguido de un daño al tejido. Un equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular es necesario para mantener esa integridad estructural y funcional.

Las metaloproteinasas de matriz así como sus inhibidores desempeñan un papel crucial en todo proceso que involucra el remodelaje de la matriz extracelular, tanto en condiciones normales como patológicas (10, 11, 12). La regulación de las MMPs ocurre a nivel transcripcional, a nivel de activación de las proenzimas y a través de la interacción con inhibidores específicos, los TIMPs, así, su actividad neta en la matriz extracelular depende completamente del balance entre los niveles de enzima activa y los niveles de TIMPs. La pérdida de este balance desempeña un papel importante en la patogénesis de diferentes enfermedades como lo es la Fibrosis Pulmonar Idiopática (71, 72, 73).

Un aspecto importante en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática es el metabolismo alterado de varios componentes de la matriz extracelular como lo es la colágena lo que lleva a un remodelaje inadecuado de la matriz extracelular. Un decremento en la degradación de colágena es un mecanismo esencial para su depósito en el pulmón; existen numerosas evidencias que indican que la actividad colagenolítica disminuida en fibrosis pulmonar idiopática está relacionada con una sobreexpresión de los TIMPs (71, 73).

En base a lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue analizar la expresión del *Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas tipo 4* en Fibrosis Pulmonar Idiopática.

Inicialmente se propuso que la expresión de TIMP-4 era tejido-específica, expresándose constitutivamente en corazón. En este trabajo se muestra por primera vez la expresión de TIMP-4 en pulmón en condiciones patológicas, específicamente en fibrosis pulmonar idiopática, utilizando hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y RT-PCR.

Observamos por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica que las células epiteliales expresan TIMP-4, probablemente sea un mecanismo para regular la sobreactividad de las gelatinasas A y B, ya que TIMP-4 además de ser un inhibidor específico de la MMP-2 y -9, regula negativamente la activación de la pro-gelatinasa A en la superficie celular.

Los macrófagos intersticiales juegan un papel importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar favoreciendo un aumento en la actividad inhibitoria, sintetizando TIMP-1, TIMP-3 y como se ha mostrado en este trabajo, TIMP-4, además de participar como productores activos de citocinas y de factores de crecimiento que a su vez regulan la expresión de varias MMPs y TIMPs.

Observamos que agregados de células plasmáticas (estadio final de maduración del linfocito B) sintetizan TIMP-4, mostrando que estas células además de ser capaces de modular la respuesta inflamatoria produciendo citocinas y anticuerpos, también tienen la habilidad de producir MMPs y TIMPs.

Por PCR, y confirmando los resultados obtenidos por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica observamos que TIMP-4 no se expresa en pulmón normal, mientras que es altamente expresado en los pulmones fibróticos, lo que sugiere que hay un mecanismo que estimula la expresión de TIMP-4 en el pulmón en condiciones patológicas.

El papel que desempeña TIMP-4 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática se desconoce, sin embargo, debido a que se encuentra altamente expresado en los pulmones fibróticos por 3 tipos celulares diferentes, es probable que TIMP-4 participe activamente como inhibidor favoreciendo la estabilidad y depósito de las fibras de colágena contribuyendo así en el remodelaje inapropiado de la matriz extracelular.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo y en conjunto con estudios realizados simultáneamente, en los cuales se analizó la expresión de TIMP-1, 2 y 3 en fibrosis pulmonar idiopática (64, 71), se ha mostrado una elevada expresión intersticial de los 4 inhibidores en comparación con la expresión de colagenasas.

TIMP-1 fue localizado en macrófagos intersticiales y en células tipo fibroblasto, TIMP-2 en focos de fibroblastos y miofibroblastos y en células epiteliales y TIMP-3 fue observado principalmente en lámina elástica (64, 71).

La colagenasa intersticial (MMP-1) fue detectada principalmente en macrófagos alveolares y células epiteliales, la colagenasa 2 (MMP-8) fue observada en algunos neutrófilos, mientras que la expresión de la MMP-13 no fue detectada (64, 71) .

Estos resultados muestran que existen un notable desequilibrio entre colagenasas (que son las responsables de degradar colágenas fibrilares) y sus inhibidores, ya que no se observó su expresión en el intersticio mientras que la expresión de los TIMPs fue principalmente intersticial, lo que indica que la elevada expresión de los TIMPs en relación a las colagenasas favorece el depósito de fibras de colágena en el intersticio pulmonar.

Se han realizado varios estudios de esta enfermedad tanto en humanos como en modelos experimentales, sin embargo los mecanismos moleculares y celulares que desencadenan la enfermedad, así como los que ocurren durante la respuesta fibrótica aun no se conocen con precisión, por ello se requieren estudios más detallados, en particular sobre la regulación de la expresión de TIMP-4 en la patogénesis de la FPI para contribuir así al desciframiento de los eventos que en ella ocurren.

## *Bibliografía*

---

1. Pardo, A. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. **Rev. Inst. Nal. Enf. Res. Méx.** 6: 156-164, 1993.
2. Aumailley M, Gayraud B. Structure and Biological activity of the extracellular matriz. **J. Mol. Med.** 76: 253-265, 1998.
3. Van der Rest M, Garrone R. The collagen family of proteins. **FASEB J.** 5:2814-2823, 1992.
4. Van der Rest M, Bruckner P. Collagens: diversity at the molecular and supramolecular levels. **Curr. Op. Struct. Biol.** 3:430-436, 1993.
5. Schwarzbauer J. E., Sechler J.L. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. **Curr. Op. Struct. Biol.** 11: 622-627, 1999.
6. Schwarzbauer J. E., Sechler J.L. Control of Cell Cycle Progression by Fibronectin Matrix Architecture. **J. Biol. Chem.** 273: 2533-2536, 1998.
7. Eickelberg, O. y Roth M. Molecular mechanisms of TGF- $\beta$  antagonism by interferon  $\gamma$  and cyclosporine A in lung fibroblast. **FASEB.** 15: 797-806, 2001.
8. Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. **Curr. Op. Struct. Biol.** 8:618-624, 1996.
9. Henry MD, Campbell KP. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. **Cell.** 95:859-870, 1998.

11. Nagase H, Woessner B. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.** 274: 21491-21494, 1999.
12. Pardo, A.; Selman, M. Matrix metalloproteinases and lung injury. **Braz J Med Biol. Rev.** 29(1996) 1109-1115.
13. Birkedal-Hansen, H., et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.** 4: 197-250, 1993.
14. Massova I, et al. Matrix metalloproteinases: structure, evolution and diversification. **FASEB J.** 12: 1075-1095, 1998.
15. Ravanti L, et al. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblast by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. **J. Biol. Chem.** 274: 2446-2455, 1999.
16. Uria J A, et al. Collagenase-3 (MMP-13) expresión in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. **Am J Pathol.** 153: 91-101, 1998.
17. Becerril C, et al. Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblast. **Am J Respir Cell & Mol Biol.** 20: 1020-1027, 1999.
18. Pardo A, Selman M. Proteinase- antiproteinase imbalance in the pathogenesis of Emphysema. The role of metalloproteinases in the lung damage. **Histology & Histopatology.** 14:227-233, 1999.

19. Pardo A, et al. Gelatinases A and B are upregulated in lung rats by subacute hyperoxia. Pathogenetic implications. **Am J Pathol.** 153: 833-844, 1998.
20. Legrand C, et al. Airway epithelial cell migration dynamics: MMP-9 role in cell extracellular matrix remodeling. **J Cell Biol.** 146: 517-529, 1999.
21. Streuli C. Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. **Curr. Op. in Cell Biol.** 11: 634-640, 1999.
22. Murphy G, Gavriolic J. Proteolysis and cell migration : creating a path?. **Curr. Op. in Cell Biol.** 11: 614 – 621, 1999.
23. Pilcher B, et al. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. **J Cell Biol.** 137: 1445-1457, 1997.
24. Ashworth J L, et al. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodeling. **Biochem J.** 340, 171-181, 1999.
25. Eickelberg O, et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3. **Am J Physiol.** 276: L814- L824, 1999.
26. Kapanci Y, et al. Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Respir Crit care Med.** 1552: 2163-2169, 1999.

27. Luparello C, et al. Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP-1) and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. **Breast Cancer Res & Treat.** 54: 235-244, 1999.
28. Nemeth J A, et al. TIMP-2 growth stimulatory activity: A concentration and cell type specific response in the presence of insulin. **Exp Cell Res.** 224: 111-115, 1996.
29. Uhal B D, et al. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts un advanced fibrotic human lung. **Am J Physiol.** 275: L819- L828, 1995.
30. Wang R, et al. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. **Am J Physiol.** 277: L1158- L1164, 1999.
31. Bienkowski R. Gotkin M. Control of collagen deposition in mammalian lung. **Society Exp. Biol. Med.** 209: 118-134, 1995.
32. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr. Op. in Cell Biol.** 7:728-735, 1995.
33. Brenner D, et al. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- alfa. **Nature.** 337:661-663, 1990.
34. Butler G, et al . Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the Tissue inhibitors of metalloproteinases. **Eur J Biochem.** 244: 653-657, 1997.

35. Campbell C, et al. Identification of a serum and phorbol ester responsive element in the murine Tissue Inhibitor of Metalloproteinase gene. **J Biol Chem.** 266: 7199-7206, 1991.
36. Cao J, et al. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional domain required for pro-gelatinase A activation. **J Biol Chem.** 270:801-805, 1995.
37. Driscoll K. Macrophage Inflammatory Proteins: biology and role in pulmonary inflammation. **Exp Lung Res.** 20: 473-490, 1994.
38. Goetzl E, et-al. Matrix metalloproteinases in immunity. **J Immunol.** 156: 1-4, 1996.
39. Gómez D, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **Eur J Cell Biol.** 74: 111-122, 1997.
40. Grande J. Role of transforming growth factor-B in tissue injury and repair . **Society Exp Biol Med.** 214: 27-40, 1997.
41. Greene J, et al. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinases 4. **J Biol Chem.** 271: 30375-30380, 1996.
42. Hayashi T, et al. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lung patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. **Am. J Pathol.** 149: 1241-1256, 1996.

43. Ito A, et al. Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblast. **FEBS**. 269: 93-97, 1996.
44. Apte S, et al. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (timp-4): isolation and expression in adult mouse tissues. **FEBS Lett.** 401: 213-217, 1997.
45. Pardo A, et al. Alveolar epithelial cells constitutively produce several members of matrix metalloproteinases family. **Am J Respir Crit Care Med.** 151, A180, 1995.
46. Pardo A and Selman M. Matrix metalloproteinases and lung injury. **Brazilian J. of Medical and Biol. Res.** 29: 1109-1115, 1996.
47. Pardo A, et al. Lung alveolar epithelial cells synthesize interstitial collagenase and gelatinases A and B in vitro. **Int. J Biochem. Cell. Biol.** 29: 901-910, 1997.
48. Selman M and Pardo A. Pathogenic mechanisms in the development of diffuse pulmonary fibrosis. **Brazilian J. of Medical and Biol. Res.** 29: 1117-1126, 1996.
49. Kaminski N, et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. **PNAS.** 97: 1778-1783, 2000.
50. Steven M y D Sheppard. Functional genomics and expression profiling. Be there or be square. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 23: 265-269, 2000.

51. Apte S, et al. Cloning of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-4 gene (TIMP4) and localization of the TIMP4 and Timp4 genes to human chromosome 3p25 and mouse chromosome 6, respectively. **Genomics**. 51: 148-151, 1998.
52. Leco K, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is the major metalloproteinase inhibitor in the decidualizing murine uterus. **Mol. Reproduction and Development**. 45: 458-465, 1996.
53. Douglas D, et al. Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. **J. of Prot. Chem.** 16:237-255, 1997.
54. Kenney M, et al. Localization of TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, gelatinase B and gelatinase A in pathological human corneas. **Current eye research**. 17: 238:246, 1998.
55. Hayakawa T, et al. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. **J. of Cell Science**. 111: 1147-1153, 1998.
56. Bigg H, et al. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor metalloproteinases-4 (TIMP4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. **J Bio. Chem.** 272(24): 15496-15500, 1997.
57. Liu Y, et al. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP4). **J Bio. Chem.** 272(33): 20479-20483, 1997.

58. Pohar N, et al. Invertebrate tissue inhibitor metalloproteinases: Structure and Nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human. **Genomics**. 57: 293-296, 1999.
59. Brew K, et al. Tissue inhibitor metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochimica et Biophysica acta**. 1477: 267-283, 2000.
60. Di Girolamo N, et al. Expresión of matriz metalloproteinases by human plasma cells and B lymphocytes. **Eur. J. Immunol.** 28: 1773-1784, 1998.
61. Willenbrock F, et al. Structure-function relationships in tissue inhibitors of metalloproteinases. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.** 150: s165-s170, 1994.
62. Nagase H, et al. Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS) during matrix metalloproteinase activation. **Intracellular protein catabolism**. Plenum Press, New York, 1996.
63. Apte S, et al. The gene structure of tissue inhibitor metalloproteinases-3 (TIMP-3) and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. **J Bio. Chem.** 270: 14313- 14318, 1995.
64. Selman M, et al. TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment?. **Am. J Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 279: L-L, 2000.

65. Gaxiola M, et al. Población celular del pulmón. **Neumología y cirugía de tórax.** 56(1): 5- 28, 1997.
66. Velasco G, et al. Human MT6- Matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expresión in brain tumors. **Cancer Research.** 60: 877- 82, 2000.
67. Geraldine A, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. **J Respir. Crit. Care Med.** 156: 240-247, 1997.
68. Fridman R. TIMP-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the MT1-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. **J. of Biol. Chem.** 41415-41423, 2000.
69. Tummalapalli C. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. **J. of cellular biochem.** 80: 512-521, 2001.
70. Fridman R. Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. **Biochem. and biophys. Research communications.** 281: 126-130, 2001.
71. Selman M, Pardo A, Talmadge E. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its patogénesis and implications for therapy. **Annals of internal medicine.** 134: 136-151, 2001.

72. Selman M. **Neumopatías intersticiales difusas**. México, D.F. Ed. Panamericana, 1997.
73. Hoeffler W. **Collagenases**. Texas, E.U. Ed. R.G. LANDES, 260 pp.
74. Maniatis, T., *et al.* 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 1.32, 1.73-1.82 pp.
75. García A. J. A., 1999. " Expresión de la metaloproteinasa asociada a membrana tipo 3 (MT-MMP3) en fibroblastos de pulmón de cobayo". Tesis profesional de biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

### **Medio LB (Luria Bertani)**

Para 1000 ml

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g

\* Se ajusta el volumen de la solución a 1 litro con H<sub>2</sub>O desionizada.

\* Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 5N.

### **Solución de prehibridación**

Formamida desionizada	50%
SSC	4x
Denhardt's	1x
DNA de esperma de salmón	10mg/ml
tRNA	10mg/ml
Dextrán sulfato	50%

### **Solución de equilibrio**

Formamida	50%
NaCl	0.6M
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
DTT	10 mM
Heparina	50µg/µl

### **SP6 RNA Polimerasa**

Enzima compuesta por una cadena polipeptídica de 96 kDa derivada del bacteriófago SP6, requiere DNA como templado y  $Mg^{2+}$  como cofactor para la síntesis de RNA.

### **T7 RNA Polimerasa**

Enzima compuesta por una cadena polipeptídica de 98 kDa derivada del bacteriófago T7, requiere DNA como templado y  $Mg^{2+}$  como cofactor para la síntesis de RNA.

### ***Taq Gold* DNA Polimerasa**

Esta enzima tiene un anticuerpo acoplado el cual inhibe la actividad de la polimerasa y con un mecanismo temperatura-dependiente ( $95^{\circ}C$ ), el anticuerpo es desacoplado y se reestablece la actividad de la enzima, eliminando la amplificación no específica durante la reacción.