



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ÁREA EXPERIMENTAL**

**EVALUACIÓN DE PPAR- $\gamma$ -1 EN LA FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA EN UN  
RATÓN DEFICIENTE DE LA MMP-19**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**BIOL. LUIS ANTONIO PLÁCIDO MÉNDEZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO CEMO  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**COMITÉ TUTORAL: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS  
INSTITUTO DE MEDICINA GENOMICA**

**DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

**MÉXICO, D.F.**

**MAYO 2013.**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

ÁREA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE PPAR- $\gamma$ -1 EN LA FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA EN UN  
RATÓN DEFICIENTE DE LA MMP-19**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. LUIS ANTONIO PLÁCIDO MÉNDEZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO CEMO  
FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTORAL: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS  
INSTITUTO DE MEDICINA GENOMICA

DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

MÉXICO, D.F.

MAYO 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/159/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de febrero de 2013**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **PLACIDO MÉNDEZ LUIS ANTONIO** con número de cuenta **302300439** con la tesis titulada "**Evaluación del PPAR -y-1 en la fibrosis pulmonar inducida en un ratón deficiente de la MMP-19**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. ANNIE PARDO CEMO**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Vocal: DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ  
Secretario: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS  
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ  
Suplente: DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de abril de 2013

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/mnm

## **Agradecimientos**

- **Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de pertenecer a tan distinguido programa.**
  
- **Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. de registro 365862).**
  
- **Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por la aportación de reactivos y material biológico.**
  
- **Por su invaluable apoyo agradezco de manera muy especial a mi tutora:**

**Dra. Annie Pardo Cemo**

**A los miembros de mi comité tutorial.**

**Dra. Vilma Maldonado Lagunas**

**Dra. Criselda Mendoza Milla**

**Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo del Dr. Moisés Eduardo Selman Lama**

## **Agradecimientos.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a esta prestigiada casa de estudios.**

**A mi tutora la Dra. Annie Pardo por apoyarme siempre en todos los sentidos y abrirme las puertas de su laboratorio y su equipo de trabajo.**

**Al Dr. Moisés Selman por su interés su apoyo durante la realización de este trabajo.**

**A los investigadores tanto de el laboratorios de bioquímica de la Facultad de Ciencias y de biología molecular y fibrosis pulmonar del INER: Remedios Ramírez, Jorge García, Sandra Cabrera, Karina Becerril, Criselda Mendoza, Martha Montañó, Carlos Ramos, José Cisneros, Víctor Ruiz, Carolina Alba, Alberto Pizaña; ya que a pesar de todas sus ocupaciones siempre tuvieron tiempo para explicarme y enseñarme las técnicas además de brindarme una bella amistad.**

**A mis amigos y compañeros de laboratorio: Miguel Negreros, Yair López, David Medina, Adrian Munguía, Yire Gómez, Miguel Cid, Semiramis Garcia, Mariel Maldonado, Jazmín Calyeca, Nathalie Rosales, Iris García, Itzue Caviedes, Sandra Aguilar y Emanuel López. Sin su apoyo y amistad incondicional no lo hubiera logrado**

**Un agradecimiento muy especial a Paul Daniel Jara por ayudarme con mis experimentos y brindarme su valiosa amistad.**

## *Dedicatoria*

*A mi hijito amado Amaury Mikael Plácido Hernández y a mi hermosa esposa y madre de mi bebe Rebeca Hernández Contreras. Sin su cariño, amor, y lo que me hacen sentir con sus sonrisas y ojitos cada vez que los veo de verdad no hubiera sido posible ni con el mejor laboratorio del mundo. Los Amo mis Pigs!!!*

*Al mejor padre del mundo por mostrarnos siempre su cariño, comprensión y su apoyo. Te amo papá.*

*A mi madre que se que siempre nos estas cuidando desde allá arriba. Te extraño Jefa*

*A mis hermanos Selene y Mauricio por estar siempre conmigo en todo momento, sin importar las circunstancias. Los amo.*

*A mis queridos sobrinos Tachuy y Mau, que con sus juegos y alegrías nos hacen el día a todos.*

*A mis tíos: Luis, Virtudes, Soledad, Laura, Tacho, Jesús, Antonio, Elena, Tiburcio, Manuel, Pablo, Oliva, Ema y Beto.*

*A mis primos: Noe, Cesar, Oscar, Rubi, Rodrigo, Ligia, Alita, Jazmina, Rafa, Luis, Norma, Jose, Tita, Celia, Tony, Elena, Lilibiana, Armando, Gustavo, Xochitl, Evelyn, Lucy, Franco, Oscar, Tita.*

*A mis amigos: Juan Carlos, Carlos Julián, Ricardo, Blanca, Avel, Aldo, Beto, Jesús, Avid, Miguel. Por su bella amistad casi hermandad.*

*A la familia de mi esposa por apoyarnos y darme a mi Rebeca*

*Y una vez mas este trabajo se lo dedico a todos mi ratoncitos MNP-19 -|- y MNP-19+|+ que fueron utilizados durante este proyecto y literalmente si no hubiese sido por ustedes esto no seria posible. Muchas gracias mis héroes y valientes ratoncitos!!!*



## Índice

**Resumen..... 1**

**Abstract .....2**

### **Introducción**

Fibrosis pulmonar .....3

Matriz extracelular .....3

Membrana basal .....4

Metaloproteinasas de la Matriz Extra Celular.....5

Matriz Metaloproteinasa – 19 RASI-1 (MMP-19)..... 9

Receptores nucleares..... 12

Receptor Proliferador Activado de Peroxisoma- $\gamma$  1 .....17

**Objetivo general.....23**

**Objetivo específico.....23**

### **Material y métodos**

Animales .....24

Inmunohistoquímica..... 24

Obtención de cultivos primarios de fibroblastos de pulmón.....25

Tratamiento con el agonista natural 15dPGJ2, sintético Rosiglitazona  
y TGF- $\beta$ 1.....25

Obtención de proteínas de medio de cultivo.....26

Ensayo de síntesis de colágena.....27

Extracción y purificación de RNA total en pulmón y cultivo celular en monocapa.....	27
Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	28
PCR en tiempo real.....	29
Análisis estadístico.....	29

## **Resultados**

Genotipificación.....	30
Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.....	31
Lavado Bronquioalveolar.....	32
Expresión de colágena $\alpha$ - tipo I (Col 1 $\alpha$ 1) en pulmones control e instilados a 7 y 21.....	33
Expresión de PPAR- $\gamma$ 1 en pulmones instilados con bleomicina....	34
Inmunohistoquímica.....	35
Efecto de agonistas del PPAR- $\gamma$ 1 en la expresión y síntesis de colágena en fibroblastos de pulmón de ratón MMP-19 +/+ y MMP-19 -/-	38
Expresión de PPAR- $\gamma$ 1 en fibroblastos MMP-19 +/+ y MMP-19 -/-	42

<b>Discusión.....</b>	<b>44</b>
-----------------------	-----------

<b>Conclusiones.....</b>	<b>50</b>
--------------------------	-----------

<b>Bibliografía.....</b>	<b>51</b>
--------------------------	-----------

## Resumen

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un amplio y heterogéneo grupo de padecimientos que afectan al parénquima pulmonar, caracterizada por un reordenamiento aberrante de la matriz extracelular en los espacios intersticiales y alveolares, así como el rompimiento de membranas basales y la presencia de focos de fibroblastos y miofibroblastos en el parénquima pulmonar desorganizando la arquitectura pulmonar y la función del órgano.

En estudios recientes se ha documentado la participación de las MMP's en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Nuestro grupo de trabajo demostró, a través de microdissección y análisis de microarreglos en pacientes FPI, que las células epiteliales hiperplásicas alrededor de los focos de fibroblastos sobre expresan la MMP-19. Asimismo, la proteína estaba aumentada en lavados bronqueo alveolares de pacientes con FPI, además también se demostró que el ratón carente de la MMP-19, instilado con bleomicina desarrollaba mayor fibrosis pulmonar que el ratón silvestre.

El receptor proliferador activador de Peroxisomas (PPAR- $\gamma$ -1) es una molécula clave en la adipogénesis normal sin embargo, durante los últimos años se ha demostrado que regula genes involucrados en la síntesis y almacenamiento de lípidos, metabolismo de la glucosa, respuesta inflamatoria, diferenciación, supervivencia y proliferación celular, así como también tener un efecto antifibrotico una vez unido a sus agonistas.

El objetivo de estudio fue evaluar el PPAR- $\gamma$ 1 en la fibrosis pulmonar inducida en un ratón MMP-19-/-.

Ratones carentes de MMP19 y silvestres fueron instilados con bleomicina y solución salina (grupo control) sacrificándose a 7 y 21 días postinstilación y se medio por medio de PCR en tiempo real la expresión de colágena, PPAR-gama1, así como un análisis inmunohistoquimico.

También se hizo extracción de fibroblastos pulmonares de ratones MMP-19+/+ y MMP-19-/- los cuales fueron estimulados con rosiglitazona y 15dPGJ2 agonistas del PPAR-gama1 y TGF-beta1 para después medirles la expresión y síntesis de colágena y PPAR-gama1.

## **Abstract.**

Pulmonary fibrosis is the end result of a large and heterogeneous group of diseases that affect the lung parenchyma, characterized by an aberrant rearrangement of the extracellular matrix in the interstitial and alveolar spaces, as well as the breakdown of basement membranes and the presence of foci of fibroblasts and myofibroblasts in the lung parenchyma and lung architecture disrupting organ function. Recent studies have documented the involvement of MMP's in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Our working group demonstrated through microdissection and microarray analysis in IPF patients, hyperplastic epithelial cells around the foci of fibroblasts to express MMP-19. Also, the protein was increased in bronchoalveolar lavage patients with IPF also demonstrated that also lacks the mouse MMP-19, developed more instilled with bleomycin pulmonary fibrosis mouse wild. Receiver Peroxisome proliferator activator (PPAR- $\gamma$ -1) is a key molecule in average however adipogenesis, in recent years it has been shown that regulates genes involved in the synthesis and storage of lipids, glucose metabolism, inflammatory response, differentiation, cell survival and proliferation, as well as have an antifibrotic action once bound to their agonists. The objective of the study was to evaluate  $\gamma$ 1 PPAR-induced pulmonary fibrosis in a mouse MMP-19-/- . Knockout mice and wild MMP19 were instilled with bleomycin and saline (control group) sacrificing postinstilación 7 and 21 days and half by real-time PCR expression of collagen, PPAR-RANGE 1, and immunohistochemical analysis. Extraction was also mice lung fibroblasts MMP-19 + / + and MMP-19- / - which were stimulated with rosiglitazone and PPAR-agonists 15dPGJ2 RANGE 1 and TGF-beta1 and then medirles expression and collagen synthesis and PPAR -RANGE 1.

La MEC está compuesta por proteínas fibrosas de dos tipos: estructurales (colágenas y elastina) y adhesivas (fibronectina y laminina); además de polisacáridos llamados glicosaminoglicanos (7).

En el pasado se creía que esta red de proteínas era sólo una estructura de anclaje y soporte mecánico para las células. Ahora se sabe que la MEC está lejos de ser una estructura inerte, ya que además de las proteínas que la caracterizan contiene factores de crecimiento y moléculas bioactivas que participan en procesos biológicos celulares como la proliferación, diferenciación y migración celular, así como de la muerte celular programada (apoptosis) entre otras. Muchas de estas actividades son reguladas por un conjunto de señales que se registran directamente a través de receptores a las moléculas de matriz tales como las integrinas (8,9,10).

Al igual que en todos los tejidos la MEC es una estructura dinámica la cual desempeña un papel clave en la morfofostasis pulmonar (11). El parénquima pulmonar está compuesto principalmente por colágenas tipo I y III, elastina, proteoglicanos y fibronectina; mientras la estructura especializada de la MEC conocida como membrana basal en la que descansan el epitelio alveolar y el endotelio está compuestas por colágena tipo IV, laminina y entactina entre otros (12).

### **Membrana Basal**

La membrana basal es una estructura especializada de la MEC que separa a las células epiteliales y endoteliales del tejido conjuntivo. Se ha observado que este tipo particular de MEC organiza y ejerce influencia sobre el comportamiento de las células mediante la interacción de moléculas específicas de la membrana basal con proteínas de la superficie celular.

Los principales componentes de la membrana basal son la colágena tipo IV, laminina, proteoglicanos heparán –sulfato, entactina, nidogen, tenacina-C y fibronectina; los cuales interactúan entre sí para producir ensamblajes supramoleculares perfectamente definidos, que tienen el potencial de generar una diversidad de estructuras (12).

## **INTRODUCCIÓN**

### **Fibrosis pulmonar**

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un amplio y heterogéneo grupo de padecimientos que afectan al parénquima pulmonar, conocidos como enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID). Se caracteriza por un reordenamiento aberrante de la matriz extracelular (MEC), este proceso se describe como la acumulación exagerada de componentes de la MEC en los espacios intersticiales y alveolares (principalmente colágenas fibrilares), así como el rompimiento de membranas basales y la presencia de focos de fibroblastos y miofibroblastos en el parénquima pulmonar (1, 2, 3).

Las EPID se pueden dividir en 2 categorías; las de etiología conocida, provocadas ya sea por la exposición a partículas inorgánicas (asbesto y sílice), partículas orgánicas (proteínas de aves y hongos) ó el uso de la radiación y algunos medicamentos quimioterapéuticos como la bleomicina (utilizada en el presente modelo experimental).

Por otra parte las de etiología desconocida, dentro de las cuales se ubica aproximadamente el 40% del las EPID actualmente reportadas, denominadas idiopáticas (1,2).

Dentro de este último grupo la mas agresiva de las EPID es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), que se caracteriza por ser habitualmente progresiva, irreversible y letal en un plazo breve de tiempo (3, 4 y 5).

### **Matriz Extracelular**

La matriz extracelular (MEC) es una red intrínseca de proteínas fibrosas y polisacáridos que ocupa el espacio extracelular, presente en animales multicelulares proporcionándoles forma e integridad estructural (6,7).

## **Metaloproteinasas de la Matriz Extra Celular**

Las metaloproteinasas de matriz o matrixinas (MMP's) reciben este nombre debido a que su sitio catalítico contiene un metal (Zn). Las MMP's son las enzimas encargadas de degradar la MEC. Desde su descubrimiento en la cola de renacuajo, actualmente se han descrito 25 MMP's en ratones y 23 en humano (13).

Las MMP's no solo tienen la función de degradar componentes de la MEC ya que también procesan mediadores bioactivos, ya sean factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas ó receptores de la superficie celular. Además participan en la iniciación de cascadas de proteinasas que impactan a muchos otros sustratos además de los propios, por lo tanto son de suma importancia en procesos biológicos como desarrollo embrionario, morfogénesis de órganos, ovulación, dilatación cervical, angiogénesis, ciclo endometrial, remodelación de hueso, reparación de los tejidos, migración, diferenciación, proliferación, adhesión y apoptosis celular y otros (1, 14, 15); también desempeñan un papel importante en algunos procesos patológicos como artritis, ulceración de los tejidos, cáncer, aneurismas, nefritis, enfermedades cardiovasculares y fibrosis (1, 13, 14).

### **Estructura de las MMP's**

La estructura de las MMPs refleja la cercana relación y evolución de las mismas dada en la conservación de sus dominios y estructura, además de los mecanismos de catálisis y regulación (10).

Existen dos tipos de MMP's, las que son secretadas hacia el exterior de la célula y las que se encuentran unidas a la membrana, también conocidas como MT-MMP's.

Las MMP's que son secretadas hacia el exterior tienen una conformación que consiste en un péptido señal, un pro-dominio, encargado de mantener el estado de zimógeno de las MMP's debido a que contiene un residuo de cisteína altamente conservado, unido por un enlace coordinado con el átomo de Zn catalítico ubicado en el dominio catalítico. Este último es el encargado de la actividad proteolítica, cuenta con una secuencia altamente

conservada (His-Glu-X-Gli-His) a la cual se encuentra unido el Zn catalítico, además de 2 a 3 iones de Ca y un ión estructural adicional de Zinc.

El dominio tipo hemopexina recibe este nombre debido a que consta de 4 secuencias repetidas parecidas a la proteína del mismo nombre, este dominio se conecta con el dominio catalítico por medio de una secuencia rica en prolina denominada bisagra, tanto el dominio hemopexina como la región de bisagra participan en el reconocimiento de la enzima por su sustrato, además de la interacción de la enzima con sus inhibidores. Todas las MMP's, excepto la 7 y la 26, tienen la región de bisagra y el dominio tipo hemopexina como se muestra en la figura 1 (1, 9, 10, 13).

Las MMP's que están unidas a la membrana celular (MT-MMP's) se unen por un pequeño dominio transmembranal seguido de un segmento citosólico muy conservado de 20 aa, como se muestra en la figura 1.



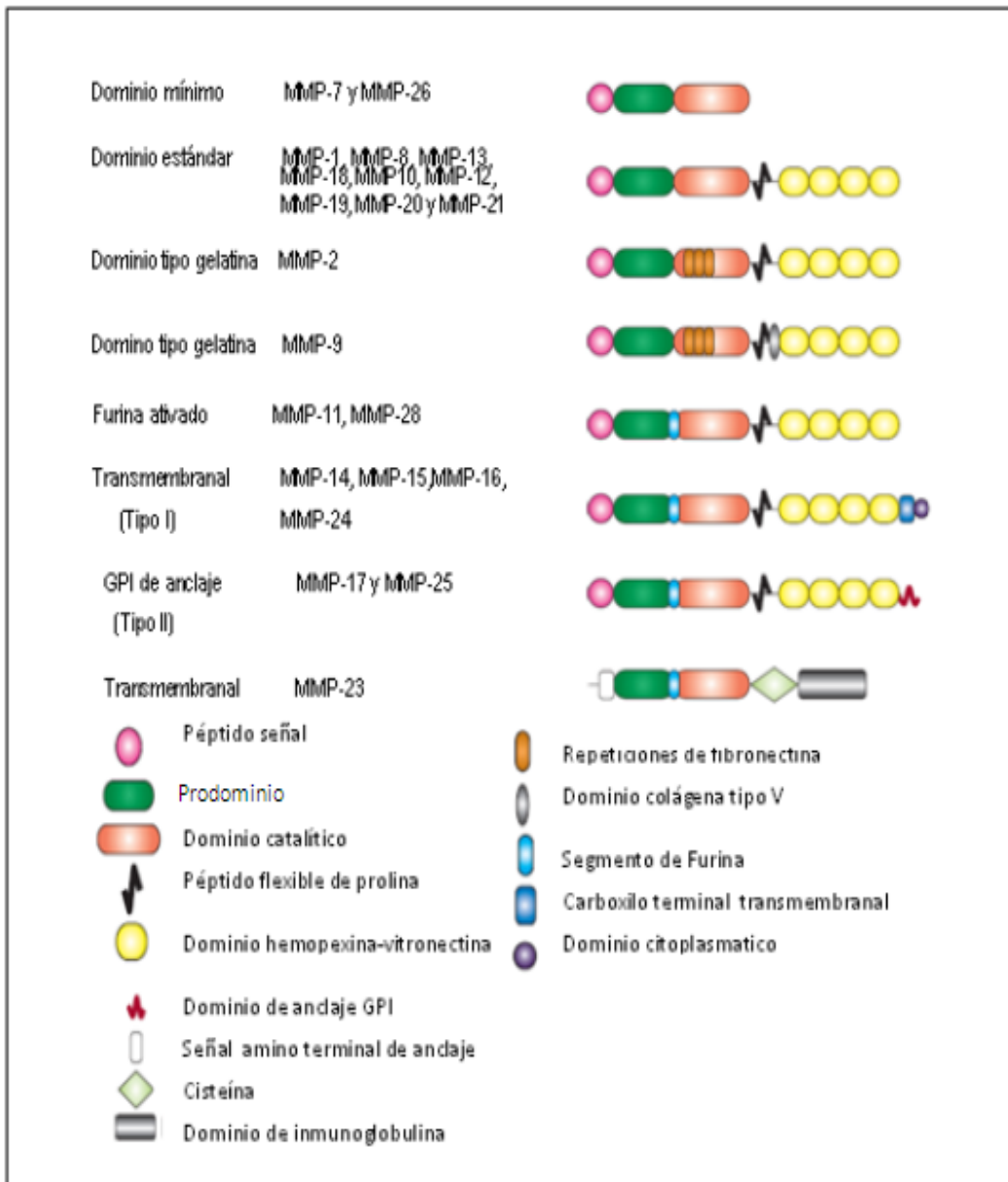


Figura 1. Dominios estructurales de las metaloproteinasas, tomada y modificada de Somerville et al., 2003.

Todas las MMP's son secretadas en forma de zimógeno, lo cual quiere decir que son inactivas, debido al pro-dominio que interacciona con el sitio catalítico por medio de un grupo tiol no pareado en el carboxilo terminal de una cisteína. Esta cisteína actúa como un

inactivador de los 4 ligandos para el átomo catalítico de Zn, resultando en la exclusión del agua y por lo tanto la inactividad de la enzima Figura.2 (10)

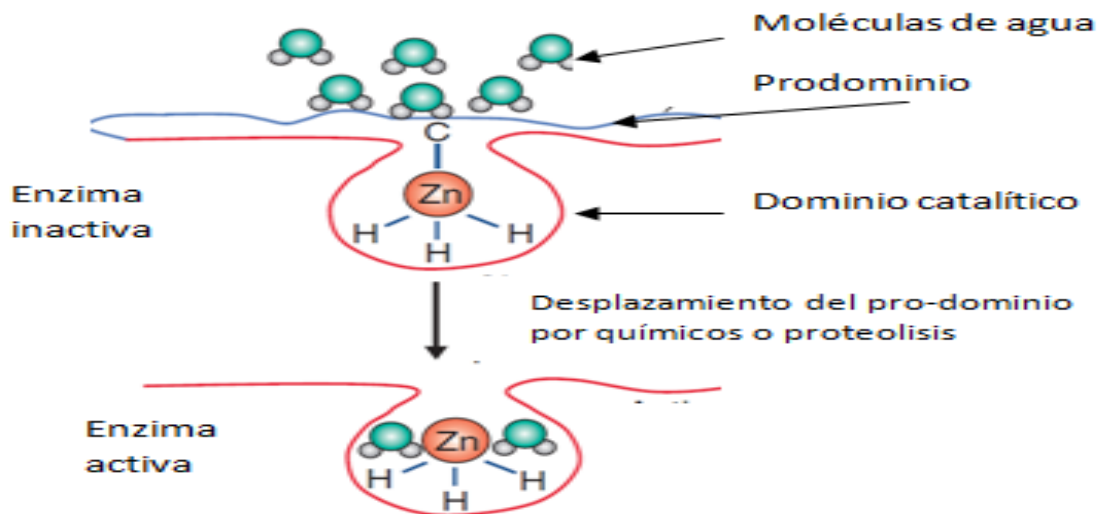


Figura 2. Activación de las metaloproteinasas, tomada y modificada de Somerville et al., 2003.

Para que la enzima pueda ser activada, la unión entre la cisteína y el Zn tiene que romperse por un cambio conformacional o proteólisis. Aunque también puede ser por medio de otras proteínas o *in vitro* por algunos agentes químicos como los tiol modificados, SDS, oxígenos reactivos, pH bajo y tratamientos de calor (9, 10 ,11).

### Regulación de las metaloproteinasas

Las MMP's tienen cuatro inhibidores específicos en vertebrados llamados Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas (TIMP's del inglés *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) 1, 2, 3 y 4, de los cuales los TIMP's 1, 2 y 4 son proteínas de secreción, mientras que el TIMP-3 se encuentra anclado a la MEC. Su función consiste en inactivar a las MMP's formando complejos enzimáticos 1:1 desplazando las moléculas de agua. (15)

No solo los TIMP's se encargan de la regulación de las MMP's, se ha comprobado que también algunos inhibidores de proteasas generales, como la  $\alpha$ 2-macroglobulina, cuya

principal función consiste en bloquear a las MMP's del plasma y fluidos tisulares. Así mismo, se ha observado que algunas proteínas recientemente descritas también inhiben a las MMP's, como TFPI-2 (del inglés *Tissue factor pathway inhibitor-2*) RECK una glicoproteína anclada a GPI, pues presentan grandes similitudes con el N-terminal de los TIMP's. (13, 14, 15).

Se ha demostrado la participación de las MMP's y de sus inhibidores (TIMP's) en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, por ejemplo a nivel de genes la MMP-7, MMP-1 y MMP-2 son sobre expresadas en FPI, así mismo en LBA se ha reportado la MMP-3, MMP-8 y MMP-9 sin embargo, no se conocen con precisión los mecanismos de su participación en esta patogénesis. En (1,4, 16, 17, 18, 19, 20).

### **Matriz Metaloproteínasa – 19 RASI-1 (MMP-19)**

La MMP-19 también conocida con el nombre de RASI-I (Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed-I), se descubrió como un autoantígeno en un grupo de pacientes con artritis. Por algún tiempo se pensó que ésta y la MMP-18 eran distintas, pero por medio de diferentes análisis de bases de datos se supo que eran la misma enzima, conservando el nombre de MMP-19 o RASI-I. El gen de esta proteasa en ratón se localiza en el cromosoma 10 en la posición 12q14. Contiene un total de 527 aminoácidos, además muestra una organización típica de una MMP soluble, incluyendo un péptido señal, un pro-dominio con un residuo de Cys (esencial para mantenerla en su estado latente) un dominio catalítico con el motivo típico de unión a Zn y un dominio tipo hemopexina; igualmente posee características que la hacen distinta de otras MMP's como una inserción de cinco residuos de ácido glutámico en la región de unión; también tiene un motivo raro de latencia en el pro-dominio y un residuo adicional de Cys en la región catalítica, sin olvidar que no tiene Asp. Por estas características tan especiales se cree que podría ser el primer miembro de una nueva subfamilia de MMP's (21, 22, 23 ,24).

Como ya se había mencionado todas las MMP's son secretadas en forma de zimógeno y de alguna forma tienen que ser activadas, ya sea por proteólisis o por cambios

conformacionales. A diferencia de otras MMP's el zimógeno de la MMP-19 es activado *in vivo* por auto proteólisis e *in vitro* por medio de un tratamiento de tripsina, se ha observado que esta MMP no es capaz de activar otras MMP's (25, 26, 27, 35).

La MMP-19 está ampliamente distribuida en varios tejidos humanos normales como pulmón, intestino, páncreas, bazo, ovario y placenta. En comparación con otros tejidos como cerebro, ojos, riñones, musculo liso y timo es poco expresada. En páncreas existe un modesto nivel de MMP19 en ratones, mientras que en humanos la expresión es alta. En cuanto a tipos celulares esta enzima se expresa constitutivamente en células vasculares de musculo liso, macrófagos, células endoteliales, células mioepiteliales, queratinocitos basales y fibroblastos (25, 26, 28). Dentro de las características de la MMP-19 se sabe que se expresa en condiciones patológicas en diferentes órganos y tejidos. En artritis esta MMP juega un papel importante ya que es la encargada de degradar la MEC y el cartílago de las articulaciones, además de liberar diferentes factores de crecimiento y unir los receptores de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF del inglés Tumor Necrosis Factor) lo que ayuda a la degradación del tejido sinovial (25). Otro dato interesante de la MMP-19 es que está sobre expresada en pacientes con artritis temprana, al mismo tiempo de estar relacionada con la angiogénesis durante la inflamación de esta patología (21, 29), al igual que en diferentes condiciones inflamatorias la MMP-19 está presente en lesiones del epitelio mamario, así como la inflamación del intestino delgado donde es sintetizada por macrófagos, fibroblastos y mucosa del epitelio, sugiriendo que induce inflamación en respuesta a citocinas inflamatorias para restaurar la mucosa y el epitelio del intestino (30). En recién nacidos de manera prematura con enterocolitis necrotizante, enfermedad gastrointestinal caracterizada histológicamente por una extensa lesión y amplia inflamación, esta MMP fue detectada en la cripta del epitelio a diferencia de tejidos sanos (31).

En el disco intervertebral la MMP-19 libera factores de crecimiento, en este caso IGF-I (Insuline Growth Factor-I), el cual tiene una función crítica ya que en las células de esta estructura actúa como mitógeno, además de tener efectos antiapoptóticos, lo cual

conlleva a la deformación de los discos. En piel la MMP-19 también es expresada por células inflamatorias como monocitos y macrófagos, su actividad degradadora sugiere que tal vez crea microambientes para la proliferación de células tumorales. Normalmente la MMP-19 no está presente en cerebro, aunque se observó que en glioblastomas (tumores cerebrales primarios) existe un aumento de su expresión, lo cual está relacionado con el aumento de grado del tumor, según con la clasificación del tumor de la OMS (22, 25, 31, 32, 33, 34).

La MMP-19 hidroliza o degrada componentes de membrana basal como colágena tipo IV, laminina5- $\gamma$ 2, nidogen, tenascina-C, fibronectina, gelatina, igualmente dos componentes de cartílago llamados agregano y cartílago oligomérico. En años recientes se ha observado que la MMP-19 procesa el IGF (Insuline Growth Factor) uniéndolo con la proteína IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3) en piel. Su actividad catalítica es inhibida por los TIMP's -2, 3, 4 y menos eficientemente el TIMP-1. (34,35, 36, 37, 38, 39)

Se ha demostrado que la MMP-19 está potencialmente aumentada en cultivos *in vitro* por una citocina llamada TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral), mediada vía extracelular por las cinasa 1/2 y P38 MAPK (Proteína Cinasa Mitogénica Activada). Esta citocina es producida por una variedad de tipos celulares como macrófagos, queratinocitos, mastocitos y células T por lo que la presencia su presencia puede estimular su producción y expresión en diferentes órganos; además del TNF- $\alpha$ , moléculas como TGF- $\beta$ , EGF y PDGF estimulan la producción de MMP-19. Se ha observado que en cuanto aumenta la actividad proteolítica de esta enzima, aumenta el número de queratinocitos debido a que su actividad contribuye a la migración (35, 40).

En estudios recientes se ha documentado la participación de las MMP's en la patogénesis de la fibrosis pulmonar (1). Nuestro grupo de trabajo demostró, a través de microdissección y análisis de microarreglos en pacientes FPI, que las células epiteliales hiperplásicas alrededor de los focos de fibroblastos sobre expresan la MMP-19. Asimismo,

la proteína estaba aumentada en lavados bronqueo alveolares (LBA) de pacientes con FPI (41).

Un hallazgo sorprendente fue que el ratón carente de la MMP-19 (MMP-19  $-/-$ ), instilado con bleomicina desarrollaba mayor fibrosis pulmonar que el ratón silvestre (MMP-19 $+/+$ ) (41).

El grupo que diseñó este ratón deficiente de la MMP-19 demostró que desarrolla obesidad bajo una dieta inducida alta en grasas; así como una reducción en la susceptibilidad a cáncer de piel inducida por el cancerígeno metilcolantreno (21).

### **Receptores nucleares**

Los receptores nucleares (RN) se describen como estructuras moleculares altamente conservadas que funcionan como factores de transcripción activando o reprimiendo la expresión de sus genes blanco. Actualmente esta súper familia de RN está compuesta por 48 miembros, los cuales participan en la señalización de hormonas esteroideas, mantenimiento y diferenciación de fenotipos celulares, ritmo circadiano, metabolismo y muerte celular por mencionar algunos procesos. Sin embargo, se tiene descrito que algunos miembros de esta súper familia tienen actividad no genómica. Algunas de estas actividades no genómicas incluyen la trans-represión de la actividad de otros factores de transcripción, Ubiquitinación, Acetilación y la activación específica de algunas cinasas como Fosfoinositol 3 cinasa (PI3K del inglés Phosphoinositide 3-Kinase) y Cinasa reguladora de señal extracelular (ERK del inglés Extracellular signal-Regulated Kinase). Por consiguiente la desregulación del sistema de señalización de los RN conduce a desórdenes reproductivos, metabólicos y causan enfermedades como cáncer, infertilidad, obesidad o diabetes (41, 42).

Algunos receptores nucleares residen en el citoplasma y una vez unidos a su ligando son translocados al núcleo, de igual modo existen RN que constitutivamente se encuentran en el núcleo sin tomar en cuenta la presencia del ligando (42, 43).

En general, como en todos los receptores transmembranales y nucleares existen dos tipos de ligandos:

- Agonistas: Son moléculas que son capaces de unirse a un receptor provocando una respuesta de señalización o transcripción de genes blanco (se muestran los agonistas de los 48 RN en la tabla 1).
- Antagonistas: son moléculas las cuales al unirse a un receptor inhiben o evitan la una cascada de señalización o transcripción de un gen blanco (43, 44).

### Estructura de los Receptores Nucleares

Los receptores nucleares son considerados factores de transcripción que regulan la transcripción de genes blanco al unirse con sus ligandos específicos. Antes de que los primeros genes que codifican los receptores nucleares (RN) fueran clonados ya se sabía que éstos eran proteínas modulares con cuatro dominios principales (A/B, C, D y E), los cuales se muestran en la figura 3. El amino terminal también conocido como la región A/B contienen un dominio de transactivación (AF-1) la cual es una secuencia de tamaño variable entre los diferentes miembros de la familia de RN, sin embargo contienen varios sitios de fosforilación e interactúan con co-reguladores o proteínas de la maquinaria transcripcional como la RNA polimerasa II o la caja TATA (TBP del inglés TATA Binding Protein). El dominio central es conocido como dominio de unión a DNA (DBD del inglés DNA Binding Domain) o dominio C, que contiene dos motivos dedos de Zn los cuales son comunes en toda la familia excepto en dos miembros. Este dominio es el encargado de unirse a las secuencias específicas de DNA llamadas elementos de respuesta (ER), los cuales constan de dos secuencias de seis nucleótidos que derivan de la secuencia RGGTCA donde R corresponde a una purina. La interacción molecular entre el DBD y el ER específico ocurre a través de los motivos dedos de zinc estructurales del DBD, determinada por la composición de aminoácidos localizada entre los dedos de Zn, conocida como la caja P (del inglés *P-box*). El dominio D o bisagra, conexión entre el DBD y el dominio de unión a ligando (DBL del inglés *Domain Binding Ligand*), es el encargado de

darle flexibilidad al receptor además de participar en la unión a la proteína chaperona de choque térmico HSP90 (del inglés *Heat Shock Protein*), la cual se encuentra unida al receptor mientras este se encuentra inactivo. EL carboxilo terminal contiene al Dominio E o Dominio de unión a ligando (DBL), altamente conservado entre varios miembros de esta familia de receptores, sin embargo diverge lo suficiente para garantizar la selección del ligando específico del receptor, aunque se ha demostrado que también es el encargado de unir al RN con otros receptores para formar homodímeros o heterodímeros. Este dominio se encuentra unido al dominio F, que contiene al Factor de Activación 2 (AF-2 del inglés *Activator Function-2*), cuando el DBL se une al ligando causa un cambio conformacional en el AF-2 creando una nueva superficie para el reclutamiento de co-activadores y co-represores, que funcionan como reclutadores de un gran número de complejos enzimáticos como acetil transferasas de histonas, deacetilasas de histonas o metil transferasas de histonas. Estos complejos alteran la estructura de la cromatina alrededor del promotor de los genes blanco y así regula la transcripción del gen (41, 42, 44, 45, 46,47).

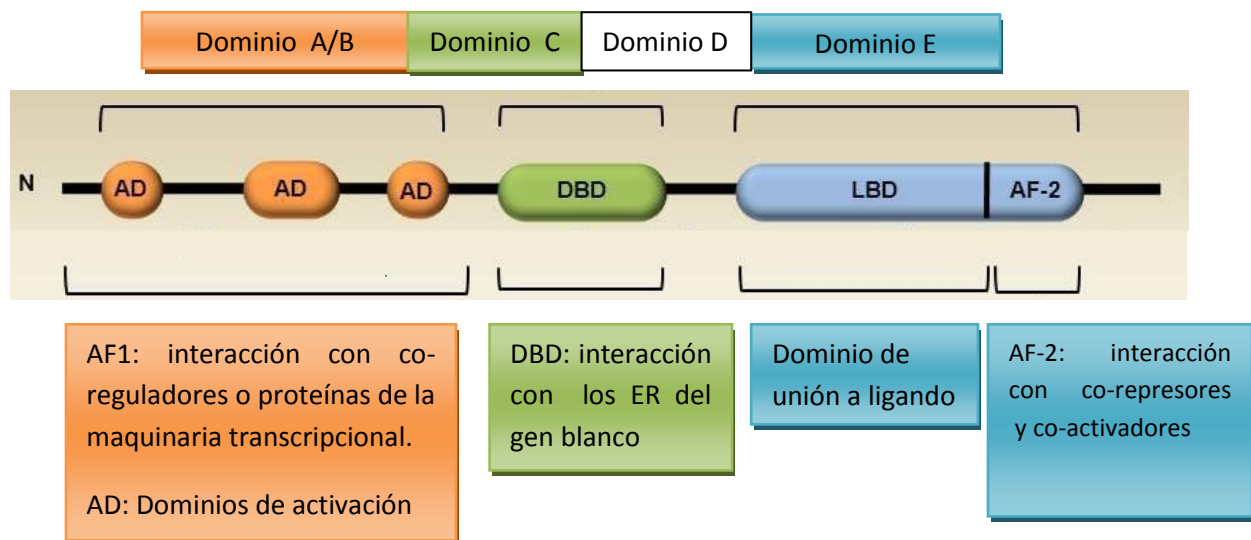


Figura 3. Estructura y función de dominios de los Receptores Nucleares, tomada y modificada de Zasadowski et al. 2012



**Table 1**

List of NRs in the order in which they are discussed in this review. For each NR the name and official nomenclature are indicated as well as their natural ligand(s) if known. On for the PPARs synthetic ligands are mentioned. DHA, docosahexaenoic acid; NR, nuclear receptor; and RA, retinoic acid.

Nuclear receptor	Name	Nomenclature	Ligand
<i>Endocrine receptors</i>			
Estrogen receptor $\alpha$	ER $\alpha$	NR3A1	17 $\beta$ -Estradiol
Estrogen receptor $\beta$	ER $\beta$	NR3A2	17 $\beta$ -Estradiol
Glucocorticoid receptor	GR	NR3C1	Cortisol (mouse; also corticosterone)
Mineralocorticoid receptor	MR	NR3C2	Aldosterone
Androgen receptor	AR	NR3C4	Testosterone
Vitamin D receptor	VDR	NR1I1	Vitamin D
Thyroid receptor $\alpha$	TR $\alpha$	NR1A1	Thyroid hormone
Thyroid receptor $\beta$	TR $\beta$	NR1A2	Thyroid hormone
Retinoic acid receptor $\alpha$	RAR $\alpha$	NR1B1	All-trans RA, 9-cis RA
Retinoic acid receptor $\beta$	RAR $\beta$	NR1B2	All-trans RA, 9-cis RA
Retinoic acid receptor $\gamma$	RAR $\gamma$	NR1B3	All-trans RA, 9-cis RA
Progesterone receptor	PR	NR3C3	Progesterone
<i>Adopted orphan receptors</i>			
Peroxisome-proliferator-activated receptor $\alpha$	PPAR $\alpha$	NR1C1	Fatty acids, leukotriene B <sub>4</sub> , fibrates, DHA
Peroxisome-proliferator-activated receptor $\beta/\delta$	PPAR $\beta$	NR1C2	Fatty acids
Peroxisome-proliferator-activated receptor $\gamma$	PPAR $\gamma$	NR1C3	Fatty acids, PG-j <sub>2</sub> , thiazolidinediones
Liver X receptor $\alpha$	LXR $\alpha$	NR1H3	Oxysterols
Liver X receptor $\beta$	LXR $\beta$	NR1H2	Oxysterols
Retinoid X receptors $\alpha$	RXR $\alpha$	NR2B1	9-cis RA
Retinoid X receptors $\beta$	RXR $\beta$	NR2B2	9-cis RA
Retinoid X receptors $\gamma$	RXR $\gamma$	NR2B3	9-cis RA
Farnesoid X receptor $\alpha$	FXR $\alpha$	NR1H4	Bile acids
<i>Orphan receptors</i>			
NR4A1-Nur77	Nur77	NR4A1	Orphan
NR4A2-Nurr1	Nurr1	NR4A2	Orphan
NR4A3-NOR1	NOR-1	NR4A3	Orphan
Retinoid-related orphan receptor $\alpha$	ROR $\alpha$	NR1F1	Cholesterol
Retinoid-related orphan receptor $\beta$	ROR $\beta$	NR1F2	All-trans RA
Retinoid-related orphan receptor $\gamma$	ROR $\gamma$	NR1F3	Orphan
Estrogen receptor-related receptor 1	ERR1	NR3B1	Orphan
Estrogen receptor-related receptor 2	ERR2	NR3B2	Orphan
Estrogen receptor-related receptor 3	ERR3	NR3B3	Orphan
<i>Other Nuclear Receptors</i>			
Small heterodimeric partner	SHP	NR0B2	Orphan
DAX-1	DAX-1	NR0B1	Orphan
Pregnane X receptor	PXR	NR1I2	Xenobiotics
Constitutive-androstane receptor	CAR	NR1I3	Xenobiotics
COUP-TFI	COUP-TFI	NR2F1	Orphan
COUP-TFII	COUP-TFII	NR2F2	Orphan
COUP-TFIII	COUP-TFIII	NR2F3	Orphan
Liver receptor homologue-1	LRH1	NR5A2	Orphan
Steroidogenic factor-1	SF-1	NR5A1	Orphan
Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$	HNF4 $\alpha$	NR2A1	Orphan

Tabla 1. Los 48 receptores nucleares con su nombre, nomenclatura y ligando natural conocido (a excepción de los tres receptores PPAR los cuales también contienen sus ligandos sintéticos). Tomado de Kurakula 2012.

### Receptores de Proliferadores Activados de Peroxisomas

Los receptores proliferadores activados del Peroxisoma (PPAR) pertenecen al grupo de los receptores huérfanos adoptados, formando parte de la subfamilia 1 de los receptores nucleares. Actualmente se conocen tres subtipos diferentes de los PPAR, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  y PPAR- $\gamma$ . El PPAR- $\alpha$  se descubrió en 1990, y se llamó así por su habilidad para inducir peroxisomas en respuesta a ciertos estímulos en roedores, aunque los demás subtipos de

PPAR no realizan esta actividad. Subsecuentemente los otros 2 subtipos PPAR- $\beta/\delta$  y PPAR- $\gamma$ , fueron identificados por medio de homologías. Los tres subtipos de PPAR's son codificados por diferentes genes localizados en diferentes cromosomas. En el caso del PPAR- $\gamma$  usando un promotor diferente y por splicing alternativo se obtienen 2 isoformas; PPAR- $\gamma$ 1 y PPAR- $\gamma$ 2 que contiene 30 aminoácidos adicionales en el N-terminal.

Las tres isoformas de PPAR's pueden ser activadas por una gran variedad de ácidos grasos y metabolitos de ácidos grasos, como eicosanoides hidroxilados, prostaglandinas y leucotrininas, además de varios componentes sintéticos. PPAR- $\alpha$  es específicamente activado por fibratos y otros componentes hipolipidémicos, y el PPAR- $\gamma$  es activado por medicamentos o ligandos sintéticos sensibiladores de insulina y antidiabéticos, como troglitazona, ciglitazona, pioglitazona, rosiglitazona conocidos como tiazolidinedionas y por su ligando natural prostaglandina 15dPGJ2 (48, 49).

Los PPAR's desempeñan un importante papel en la regulación de numerosos procesos celulares relacionados con el metabolismo, inflamación, diferenciación, migración y proliferación. Los tres subtipos presentan distintos patrones de distribución en tejidos, aunque pueden activar diferentes genes blanco y se ha demostrado que también pueden compartir algunos de estos. En el caso de PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\beta/\delta$  son potentes activadores de genes en la oxidación lipídica, por lo que los podemos encontrar en tejidos con un amplio rango de  $\beta$ -oxidación como por ejemplo hígado, musculo, corazón y tejido adiposo café. El PPAR- $\gamma$  activa genes relacionados con la diferenciación de adipocitos además de ser suficiente para transformar líneas celulares no adipogénicas en células tipo-adipocitos, por lo que lo podemos encontrar altamente expresado en tejido adiposo. El PPAR- $\gamma$ 2 se puede encontrar casi exclusivamente en tejido adiposo, mientras que PPAR- $\gamma$ 1 se encuentra en varios tejidos tales como adiposo, colon, bazo, hígado, músculo y pulmón (48, 50, 51, 52).

Como la mayoría de los RN's, la estructura proteínica de los PPAR's consiste de varios dominios: el N-terminal tiene el dominio A/B el cual contiene a AF-1, el dominio C donde

se encuentra el DBD, el dominio D o también conocido como región de bisagra, el dominio E comúnmente referido como LBD y finalmente el dominio F el cual contiene a AF-2. Aunque los dominios A/B y D son pobremente conservados entre los tres PPAR's, el dominio C o DBD es altamente conservado tanto en secuencia como en estructura y homología (52, 53).

Como ya se había mencionado todos los RN funcionan como factores de transcripción tras su unión a una secuencia de DNA específica conocida como ER, esta unión la podían llevar a cabo como homodímeros o heterodímeros. En el caso de los tres subtipos de PPAR's se unen al DNA como heterodímeros obligados con receptores de 9-cis ácido retinoico (RXR), aunque en la actualidad no se conoce con precisión el mecanismo de esta interacción entre los PPAR's y el RXR, se sabe que esta heterodimerización ayuda al reclutamiento de diferentes co-activadores de transcripción de ciertos genes blanco, así como también el reclutamiento de co-represores los cuales reprimen la transcripción de ciertos genes blanco (54).

### **Receptor Proliferador Activado de Peroxisoma-Gama 1**

Existen dos isoformas de PPAR- $\gamma$ , denominados PPAR- $\gamma$ 1 y PPAR- $\gamma$ 2, generados por un promotor diferente y por splicing alternativo agregando 30 aminoácidos adicionales en el N-terminal al PPAR- $\gamma$ 2 como se muestra en la figura 5. El Receptor Proliferador Activado de Peroxisomas-Gama 1, PPAR- $\gamma$ 1 (por sus siglas en inglés *peroxisome proliferator-activated receptor- gamma1*), o NR1C3 como se le conoce con la nomenclatura de los RN es una proteína de 475 aminoácidos, con su gen localizado en el cromosoma 6 en ratón, fue inicialmente descubierto por su homología en *Xenopus*. Desde su descubrimiento, se observó que era una molécula clave en la adipogénesis normal (diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos) sin embargo, durante los últimos años se ha demostrado que no solo regula genes involucrados en la síntesis y almacenamiento de lípidos pues también desempeña un papel importante en el metabolismo de la glucosa, respuesta inflamatoria, diferenciación, supervivencia y proliferación celular. Dentro de sus ligandos naturales

podemos encontrar a la 15-deoxy- $\Delta^{12}$ , 14-prostaglandina J2 (15dPGJ2), ácido nitrolinoleico y ácido lípido, y actualmente se han encontrado diferentes ligandos sintéticos denominados tiazilenoídeos, tales como rosiglitazona, pioglitazona, ciglitazona o derivados del ácido oleico llamados triterpenoides, por ejemplo el ácido 2-cyano-3,12-dioxooleano-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO)(49, 52, 55).

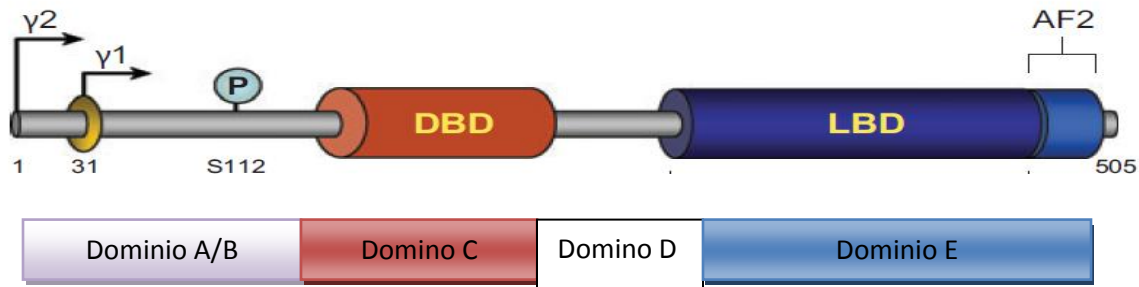


Figura 4. Estructura de PPAR- $\gamma$ 1 y 2 tomado y modificado de Tontonoz *et al.* 2008.

Cuando alguno de sus diferentes ligandos se une al PPAR- $\gamma$ 1, estos causan un cambio conformacional, lo que conlleva al reclutamiento de co-activadores transcripcionales incluyendo miembros de la familia co-activadora de receptores esteroideos SRC (*del inglés steroid receptor co-activator*) y el RXR, para formar el heterodímero, unirse a su elemento de respuesta en el ADN y así regular positivamente la transcripción de genes. En ausencia de su ligando el PPAR- $\gamma$ 1 actúa como silenciador de genes, uniéndose y reclutando complejos co-represores de la transcripción, como el co-represor de receptor nuclear N-CoR (*del inglés nuclear receptor corepressor*) o el mediador de silenciamiento de receptores retinoicos y tiroideos SMRT (*del inglés silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*). Los co-activadores y los co-represores de la transcripción se encuentran en complejos multiproteínicos que incluyen enzimas modificadoras de histonas, como las acetil-transferasa de histonas (conocida como P300/CBP) y la deacetilasa de histonas (conocida como HDAC). La actividad de estas enzimas modificadoras de histonas es afectar la transcripción de genes alterando la estructura de la cromatina (55, 56, 57).

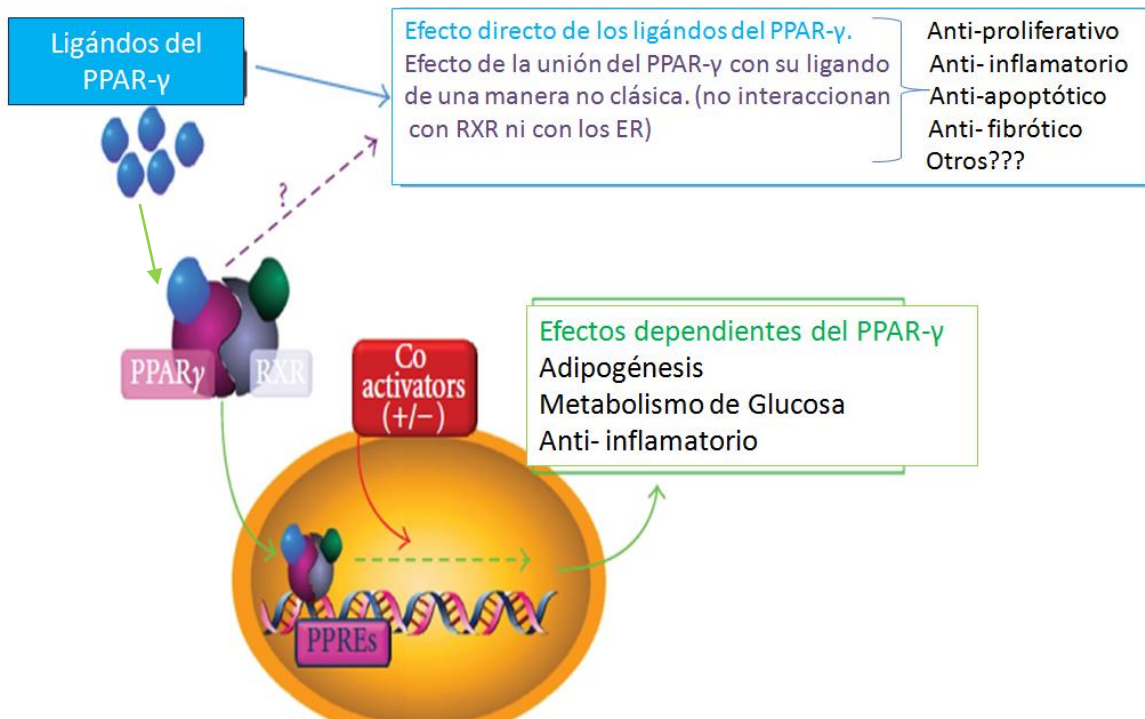


Figura 6. Los ligandos del PPAR-γ tienen múltiples efectos independientes (flecha azul). En la vía clásica, los ligandos se unen al PPAR-γ para después formar un heterodímero con el RXR, el cual se une a los ER y comienza la expresión de genes (flecha verde). También existe la vía no clásica, en la cual los ligandos se unen al PPAR-γ pero no se forma el heterodímero con el RXR y no se unen a los ER, pero aún no se conoce la vía de estos efectos (flecha morada).

El PPAR-γ1 se encuentra ampliamente distribuido, tanto en humano como en ratón, en diferentes tejidos. Lo podemos encontrar en tejido adiposo, colon, bazo, hígado, músculo y pulmón, así como en diferentes tipos celulares ya sean adipocitos, epiteliales, endotelio, neumocitos tipo II, macrófagos alveolares, hepatocitos, linfocitos C, células del músculo liso de las vías aéreas, fibroblastos, miofibroblastos, células estelares pancreáticas y hepáticas (56, 58).

Numerosos estudios han demostrado el potencial de PPAR-γ1, así mismo de sus diferentes ligandos naturales y sintéticos en la resolución y tratamiento de diferentes patologías pulmonares tales como asma, sarcoidosis, enfermedades inflamatorias, proteinosis,

cáncer y fibrosis, aunados a modelos experimentales para esta última, pues diversos autores han identificado al PPAR- $\gamma$ 1 y sus ligandos como potentes atenuadores de la fibrosis pulmonar (45).

En 2009, Ferguson y colaboradores demostraron que los ligandos del PPAR- $\gamma$ 1 CCDO, 15dPGJ2 y rosiglitazona son potentes atenuantes del efecto de TGF- $\beta$  en fibroblastos humanos, ya que al agregar el TGF- $\beta$  en combinación con los diferentes agonistas del PPAR- $\gamma$ 1, los fibroblastos no se diferencian en miofibroblastos además de suprimir la sobre expresión de  $\alpha$ -actina de musculo liso, fibronectina, colágena y calponina, todas ellas muy importantes tanto en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos como en la fibrosis pulmonar. Cabe recalcar que estos resultados se los adjudican a las diferentes propiedades de los agonistas y no tanto al PPAR- $\gamma$ 1 como tal, en el caso de rosiglitazona que inhibe la fosforilación de AKT inducida por el TGF- $\beta$ , se tiene bien documentado que la vía de PI3K/AKT participa activamente en la transición epitelio mesenquima (TEM) además de la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto (51). En el caso de 15dPGJ2 y CCDO ambas moléculas contienen un centro electrofílico que se puede unir con varias proteínas celulares y alterar alguna vía de señalización relacionada con la cascada de señalización del TGF- $\beta$ . Sin embargo, un análisis más profundo demostró que el CCDO inhibe la acetilación de CBP/p300, un importante co-factor de transcripción de varios genes entre ellos  $\alpha$ -actina de músculo liso, la cual es un marcador de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (52, 53).

Otro dato interesante en cuanto al PPAR- $\gamma$ 1 y la fibrosis pulmonar se encontró en cultivo de fibroblastos pulmonares humanos, en donde se observó que al estimular la migración celular con suero fetal bovino (SFB) y factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB por sus siglas en inglés *Plaquet Derivated Growth Factor-BB*) ésta era inhibida al agregar rosiglitazona en el medio de cultivo. Posteriormente se cultivaron los fibroblastos en ausencia y presencia de TGF- $\beta$  para estimular la proliferación y la diferenciación de fibroblasto a miofibroblastos. La proliferación fue medida por medio de citometría de flujo demostrando que ésta era inhibida en el grupo de fibroblastos estimulados con TGF- $\beta$ /

rosiglitazona. Al analizar diferentes marcadores de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos como  $\alpha$ -SMA y calponina se observó que estos marcadores no estaban presentes en los fibroblastos con TGF- $\beta$ /rosiglitazona (54).

Troglitazona y Ciglitazona, también agonistas del PPAR $\gamma$ 1, fueron probados como inhibidores de la proliferación de fibroblastos extraídos de pacientes con neumonías intersticiales y fibroblastos fetales. Estos agonistas inhibieron la respuesta proliferativa a TGF- $\beta$  en ambos casos usando una dosis/tiempo independiente, para arrestar a los fibroblastos en la fase G1/G0 del ciclo celular, mediante la inhibición de la expresión de Ciclina D1 que interactúa con diferentes ciclínas dependientes de cinasa, cuya actividad es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular. Un dato curioso es que se observó el mismo resultado en la línea celular de adenocarcinoma A549. Resulta interesante que Troglitazona y Ciglitazona también inhiben eficientemente la expresión y la síntesis de colágena por medio de PPAR- $\gamma$ 1 (55).

Se ha sugerido que no todos los miofibroblastos en la fibrosis pulmonar derivan de fibroblastos pulmonares residentes, sino que algunos miofibroblastos lo hacen de células epiteliales pulmonares vía Transición Epitelio Mesénquima (TEM) (4).

La TEM es un proceso en el cual células epiteliales diferenciadas se transforman a un fenotipo mesenquimal, dando origen a fibroblastos y subsecuentemente a miofibroblastos. Se cree que este proceso desempeña un papel importante en la reparación normal del pulmón, en la cual los fibroblastos y miofibroblastos después de reparar la herida entran en apoptosis. *In vivo* la significancia de la TEM es controversial, sin embargo, *in vitro* está muy bien descrita y caracterizada por un decremento en la expresión de E-caderina, la cual es una proteína que participa en la unión célula-célula presente en epitelio que se usa como un marcador de células epiteliales, y un aumento de N-caderina, la cual está presente en las células mesenquimales como es el caso de los fibroblastos. TGF- $\beta$  potencializa la TEM y altera la morfología de células epiteliales humanas. Como ya se tenían algunos datos sobre el efecto del PPAR- $\gamma$  en los fibroblastos y

su posible efecto antifibrotico, se decidió analizar si algunos de sus agonistas podían inhibir la TEM en la línea epitelial de adenocarcinoma A549, donde se observó que rosiglitazona y ciglitazona inhiben el efecto de TEM en las células A459, ya que éstas al recibir el estímulo de TGF- $\beta$ /Rosigitazona y TGF- $\beta$ /Cigitazona seguían conservando su fenotipo epitelial, además de la E-caderina. Los autores demostraron que el efecto era vía dependiente del PPAR- $\gamma$ , ya que al adicionar algún inhibidor del receptor se llevaba a cabo la TEM. En cuanto a la expresión de la N-caderina, esta era inhibida por ambos agonistas a través de una vía independiente de PPAR- $\gamma$ , ya que al agregarle un inhibidor del receptor continuaba la inhibición, por lo que el efecto se atribuye a una vía independiente al PPAR- $\gamma$  (56).

Actualmente se tienen pocos reportes de del efecto de PPAR- $\gamma$  y sus ligandos en modelos experimentales de fibrosis pulmonar. En 2008 se observo que Troglitazona administrada de forma oral diaria inhibía la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones, con reducciones en el contenido de colágena y TGF- $\beta$  en el pulmón (57). Rosigitazona y 15dPGJ2 fueron también probados en el modelo experimental de fibrosis por bleomicina en ratones, y los investigadores demostraron que ambos agonistas disminuían la mortalidad, inflamación, flujo celular y la fibrosis. Para comprobar si el efecto antifibrotico de Rosigitazona y 15dPGJ2 era dependiente del PPAR- $\gamma$ 1 se les administro a los ratones un antagonista del PPAR- $\gamma$ 1 conocido como BADGE (del inglés Bisphenol a diglycidyl ether), el cual revertía los efectos fibróticos de la bleomicina aunque se administraban los agonistas Rosigitazona y 15dPGJ2, sugiriendo que la actividad antifibrótica de estos compuestos es mediada por un mecanismo dependiente del PPAR- $\gamma$ 1 (58, 59).

En virtud de que el ratón deficiente de la MMP-19 desarrolla una respuesta fibrótica más severa a la bleomicina en comparación al ratón silvestre y que éste ratón deficiente de la MMP-19 desarrolla obesidad inducida por dieta alta en grasas, el objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de PPAR- $\gamma$  en fibrosis pulmonar experimental inducida por bleomicina en ratones MMP-19 -/- y en ratones MMP-19 +/-.



### Objetivo general

Evaluar el papel de PPAR- $\gamma$  en fibrosis pulmonar experimental en un ratón deficiente de MMP-19.

### Objetivos específicos:

1. Determinar la expresión de PPAR- $\gamma$ 1 en fibrosis experimental inducida por bleomicina en pulmón de ratón normal y deficiente de MMP-19.
2. Localizar las células expresan PPAR- $\gamma$ 1 *in vivo*.
3. Examinar el efecto de agonistas del PPAR- $\gamma$ 1 sobre síntesis de colágena en fibroblastos de pulmón de ratón normal y deficientes de MMP-19.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Animales**

Ratones MMP-19  $+/+$  y MMP-19  $-/-$  de 8 semanas de edad fueron anestesiados con Avertin® (Tribromoetanol 2.5 gm 2,2,2; 5 ml 2-methyl-2-butanol disuelto en 200 ml de agua destilada), para recibir una dosis de Bleomicina de 0.05u/10gr de peso por vía intratraqueal en dosis única. El medicamento fue administrado en un volumen de 50 $\mu$ l. Los animales controles fueron instilados solo con 50 $\mu$ l de solución salina.

Posteriormente los animales fueron sacrificados en diferentes períodos de tiempo después de la instilación (0, 7 y 21 días) para evaluar la respuesta inflamatoria y la respuesta fibrosante.

### **Inmunohistoquímica**

El pulmón derecho fue fijado por instilación a presión constante con paraformaldehído al 4% en PBS 1x. A continuación el tejido fue deshidratado en alcohol etílico a diferentes concentraciones (30, 50, 70 y 96%) y finalmente en xilol, por último se embebió el tejido en parafina y se hicieron cortes de 5 $\mu$ m. La extensión y grado de de las lesiones, así como el porcentaje de inflamación y fibrosis, fueron evaluados después de la tinción tricrómica de Masson y Hematoxilina- Eosina.

Para la localización de PPAR- $\gamma$ 1 en el pulmón, los tejidos fueron desparafinados en xilol por 30 minutos y después rehidratados (etanol 100, 90, 50% y agua). Para eliminar la actividad de peroxidasa endógena, los tejidos se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) en metanol por 10 minutos. Posteriormente se realizó la recuperación de antígenos incubando los tejidos en buffer de citratos 10mM (pH6.0) y calentando las laminillas en un horno de microondas por 5 minutos. Para evitar uniones inespecíficas antígeno-anticuerpo, los tejidos fueron tratados con suero de borrego diluido 1:100 en PBS por 20 minutos y con solución bloqueadora (Dako, Corp., Carpinteria, CA.). Los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario por 18hrs a 4°C. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-PPAR- $\gamma$ 1 (4  $\mu$ l/ml; Santa Cruz SC7273). Posteriormente los tejidos se

incubaron con un anticuerpo secundario marcado con biotina y un complejo estreptavidina- peroxidasa (BioGenex), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para revelar, los tejidos se incubaron con 3-amino-9etil- carbazol (AEC, BioGenex) como cromógeno, en un buffer de acetatos con 0.05% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y finalmente los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. En algunos tejidos el anticuerpo primario fue remplazado por suero no inmune como control negativo.

### **Obtención de cultivos primarios de fibroblastos de pulmón**

Los fibroblastos de pulmón MMP-19+/+ y MMP19-/- se extrajeron por medio de un tratamiento enzimático con tripsina-EDTA. Posteriormente se sembraron en cajas Falcon de 25cm<sup>2</sup> con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomina.

### **Tratamiento con el agonista natural 15dPGJ2, sintético Rosiglitazona y TGF-β1**

15-desoxi-delta-12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) es una ciclopentanona, producto final de la deshidratación de PGD<sub>2</sub>. En particular, 15d-PGJ2 es reconocido como el ligando natural endógeno para el receptor PPAR-γ-1, esta propiedad es responsable de muchas de las funciones antiinflamatorias de 15d-PGJ2, además de tener efectos antifibroticos *in vitro*.

Rosiglitazona es una tiazolidinediona que constituye un grupo de fármacos para el tratamiento de la diabetes tipo II que reducen la glucemia al disminuir la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado. Es un ligando sintético del PPAR-γ-1, que al unirse tienen una acción beneficiosa en el control de la glucosa, además se ha demostrado que este agonista también posee un efecto antifibrotico *in vitro*.

El factor de crecimiento transformante beta 1, TGF-β1 es una proteína perteneciente a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta. Es una proteína de secreción que lleva a cabo diversas funciones en la célula, como el control del crecimiento celular, proliferación celular, procesos de diferenciación y apoptosis. Asimismo se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que este factor de crecimiento tiene un efecto profibrosante.

Una vez que los cultivos primarios alcanzaron un 80% de confluencia en pozos de cajas de 6 pozos se retiro el medio de cultivo de las células y se lavaron dos veces con buffer de fosfatos PBS, fueron depositadas 12 hrs en medio DMEM sin SFB para ser expuestas a los diferentes estímulos (figura 6) disueltos en 2ml de medio DMEM sin SFB por 48 horas para el ensayo de síntesis de colágena por el método de Sircol y 24hrs para el ensayo de expresión de colágena 1 $\alpha$ 1 y PPAR- $\gamma$ 1 por PCR en tiempo real.

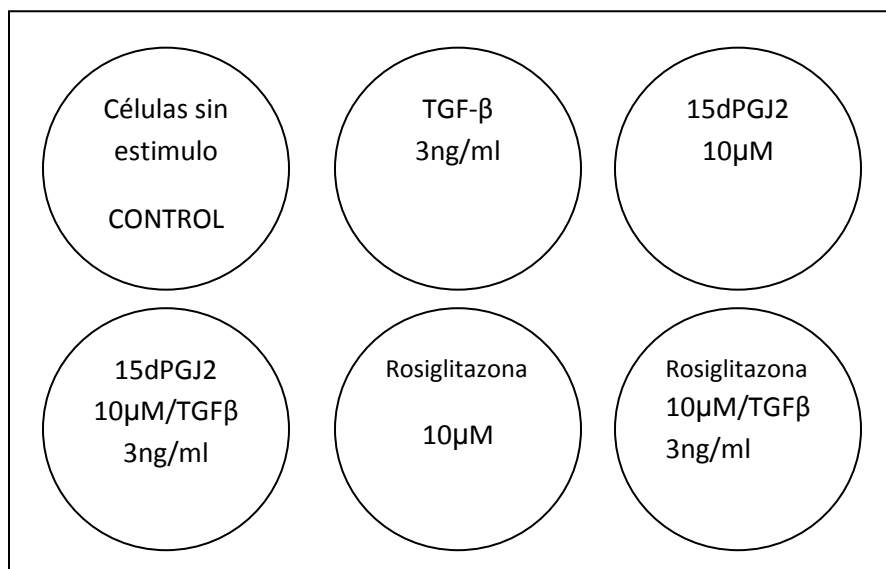


Figura 6. Cultivos primarios de fibroblastos MMP-19 +/+ y MMP-19 -/- en diferentes condiciones; cada una de las condiciones se fue llevada a cabo en 3 líneas celulares MMP-19 +/+ y 3 líneas celulares MMP-19 -/- por triplicado tanto el ensayo de síntesis de colágena como para los ensayos de expresión de colágena 1 $\alpha$ 1 y PPAR- $\gamma$ 1.

#### **Obtención de proteínas de medio de cultivo**

Las proteínas se obtuvieron del medio condicionado, colectado después del estímulo de las células con el agonista natural 15dPGJ2 y el agonista sintético Rosiglitazona respectivamente por 48hrs. Una vez pasado el tiempo de estímulo con los agonistas se extrajeron los 2 ml de medio condicionado en el cual iban diluidos los 2 agonistas (15dPGJ2 10 $\mu$ M y Rosiglitazona 10 $\mu$ M) y se centrifugaron a 1200rpm por 5 minutos,

después se extrajo el sobrenadante e inmediatamente se pusieron a dializar en membranas para diálisis (Spectra/Por molecularporous membrane, SPECTRUM) en cuatro litros de agua dde a 4°C con un coctel de inhibidores de proteasas constituido por: 10ml de PMSF diluido en etanol a 100mM, 100ml de EDTA diluido en agua dde a 1M, 200ml de NaN<sub>3</sub> azida diluido en agua dde al 1% y 10ml de NEM diluido en etanol a 2 M. Se llevaron a cabo 4 cambios del agua de diálisis en un transcurso de 12 horas, pero solo en el primero se le añadió el coctel de inhibidores de proteasas.

Una vez que los medios de cultivo estuvieron 12 hrs en diálisis, se liofilizaron a sequedad para después resuspender el liofilizado de la proteína en 50µl de agua dde y hacer una cuantificación por el método de Bradford y su lectura en un espectrofotómetro Beckman DU640.

### **Ensayo de síntesis de colágena**

Ya cuantificada la proteína se cargaron 30µg en tubos eppendorf de 1.5ml y se agregó 1 ml de de reactivo de Sircol (collagen assay kit Biocolor, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante, para por ultimo cuantificar la proteína por medio del micro método de cuantificación usando un lector de ELISA (Thermo Labsystems, Multiskan EX) a 550nm.

### **Extracción y purificación de RNA total en pulmón y cultivo celular en monocapa.**

En el caso de pulmón se pesaron 200µg del tejido y se homogenizó con un politrón y se paso a un tubo eppendorf de 1.5ml, donde se le agregaron 2ml de TRIzol® (TRIzol reagent, life technologies) dejándolo incubar por 5 min a temperatura ambiente.

Para la extracción de RNA en cultivo celular en monocapa (cultivos primarios de fibroblastos de ratón) dentro de la caja de cultivo celular se agregaron 2ml de TRIzol®, pasando el lisado celular varias veces por la pipeta dejándolo incubando por 5 minutos. (De aquí en adelante tanto el pulmón como el lisado celular recibieron el mismo tratamiento). A cada uno de los tubos se les adicionó 200µl de cloroformo y las muestras se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente, posteriormente las muestras se

centrifugaron a 10,000 rpm por 16 minutos a 4°C y se agregaron 2µl de glucógeno a cada muestra, posteriormente se almacenaron a -70°C durante 12 horas. Se adicionaron 500 µl de isopropanol a cada muestra y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 11 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1ml de etanol al 70% y se centrifugó a 7500-rpm por 6 minutos a 4°C, se decantaron los sobrenadantes de las muestras y se dejaron secar sobre un papel absorbente por aproximadamente 15 minutos. El RNA se suspendió en 10µl de agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbato) al 0.5%, consecutivamente se cuantificó a través de un espectrofotómetro UV (spectrophotometer NanoDrop ND-1000) a longitud de onda de 260nm. La pureza se determinó con la relación 260/280.

**Síntesis de DNA complementario (cDNA).** Para eliminar el DNA genómico contaminante 1 µg de RNA fue tratado con 1µg de DNAasa y 1 µl de Buffer (Fermentas), durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se le agregaron 2µl de EDTA 25mM y se incubó por 10 minutos a 65°C. La síntesis de cDNA se realizó por transcripción reversa. El cDNA se sintetizó utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems de acuerdo a las instrucciones del fabricante, 1µg de RNA previamente tratado con DNAasa, fue mezclado con una solución que consiste en 2µl de buffer RT 10x, 0.8 µl de dNTP's 25x, 2µl de random primers RT10x, 1.2µl de agua tratada DEPC, 1µl de inhibidor de RNAasa y 1µl de la enzima Transcriptasa Reversa. Con las siguientes condiciones en el termociclador (PERKIN ELMER GeneAmp PCR System 2400).

25°C | 37°C 37°C | 85°C | 4°C

\_\_\_\_\_

10' | 60' 60' | 5'' | ∞

## PCR en tiempo real

El cDNA sintetizado se utilizó para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), utilizando el sistema StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems). La reacción de amplificación se llevo a cabo en un volumen de 15µl con agua DEPC. Se amplificaron los productos de PPAR-γ1 y Colágena 1α1, utilizando sondas específicas para cada mensajero (Applied Biosystem tabla 2). Como gen endógeno se utilizo el 18s (gen constitutivo) en las siguientes condiciones.

50°C | 95°C 95°C | 60°C | 4°C

— — — — —

2' | 10' 15'' | 1' | ∞

Sonda Taqman	Gen
Mm01184322_m1	PPAR-g1
Mm00801666_g1	Col 1a1
Mm99999901_s1	18s

Tabla 2. Sondas Taqman utilizadas para los ensayos de expresión

### Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como promedio y desviación estándar. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey utilizando el paquete INERstat. Además las diferencias entre los grupos se establecieron mediante el método de máxima verosimilitud, cuando el valor de p fue menor a 0.05 (p<0.05).

### Resultados

## Genotipificación

Para caracterizar el genotipo de los ratones, generar unidades reproductivas y establecer las colonias MMP-19<sup>+/+</sup> y MMP-19<sup>-/-</sup>. Debido a que estos ratones no presentan diferencias fenotípicas es necesario llevar a cabo una genotipificación para poder diferenciar a estos dos grupos de organismos, para posteriormente generar los grupos experimentales, se determinó por PCR, el genotipo de los ratones, utilizando como molde DNA purificado de la cola de los animales. El DNA purificado fue cuantificado en el nanodrop (NanoDrop200, Thermo Scientific) y se usaron 100ng de DNA para cada reacción individual, usando primers específicos para cada genotipo. Como se muestra en la Figura 7, obtuvimos productos de amplificación específicos, correspondientes a los tamaños esperados MMP-19<sup>+/+</sup> (211 pb), MMP-19<sup>-/-</sup> (327 pb) y HT, ambas bandas.

MMP-19 <sup>+/+</sup> Sense (5´- 3´) TCGGCCATTGAACAAGATGG

MMP-19 <sup>+/+</sup> Anti-Sense (5´- 3´) GAGCAAGGTGAGATGACAGG

MMP-19 <sup>-/-</sup> Sense (5´- 3´) TCAAAACACGCAAAGTTGGA

MMP-19 <sup>-/-</sup> Anti-Sense (5´- 3´) ATGTGTGTTTGGCCTGAGTG

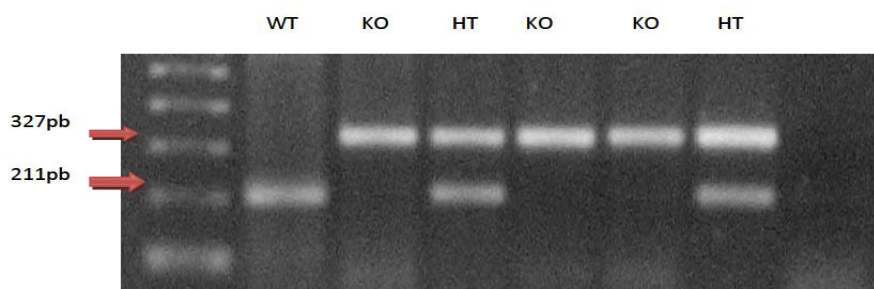


Figura 7. Gel de agarosa para el genotipificación de MMP-19. (WT) ratón silvestre de MMP-19<sup>+/+</sup> con peso molecular d 211pb, (KO) MMP-19<sup>-/-</sup> de peso molecular de 327pb. Ambos pesos moleculares correspondientes a MMP-19 <sup>+/+</sup> y MMP-19<sup>-/-</sup> por lo que se define como un organismo heterocigoto (HT) o MMP-19 <sup>+/-</sup>.

## Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina



Se instilaron con bleomicina a 8 ratones MMP-19  $+/+$  y 8 MMP-19  $-/-$  de 8 semanas de edad, así como 4 ratones de cada genotipo con solución salina, como grupo control, los cuáles se sacrificaron a los 7 días y a los 21 días.

Como se muestra en la figura 8 los ratones no mostraron diferencias significativas entre sí durante el desarrollo del modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

Como un indicador de morbilidad, monitoreamos el peso corporal de los ratones durante el desarrollo de fibrosis pulmonar. No encontramos diferencias en el tiempo cero, al comparar ratones de ambos genotipos. Después de un período de 7 días, algunos ratones registraron pérdida de peso en ambos genotipos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. Después de un período de 21 días post-instilación no encontramos diferencias en el peso corporal.

**Peso de los ratones MMP-19  $+/+$  y MMP-19  $-/-$  en el modelo de fibrosis pulmonar**

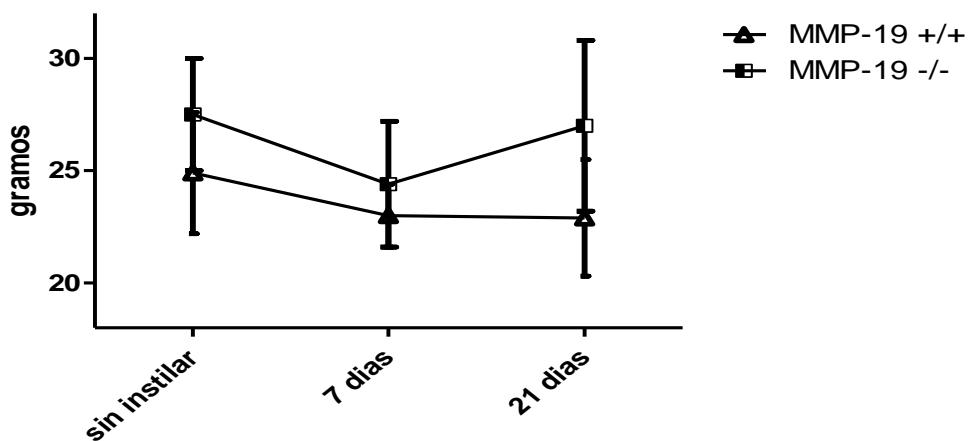


Figura 8. Pesos de los ratones MMP-19  $+/+$  y MMP-19  $-/-$  durante el modelo de fibrosis pulmonar por bleomicina. En cada punto se muestra el promedio y desviación estándar de 4 ratones por genotipo.

### Lavado Bronquialveolar

Para evaluar la respuesta inflamatoria después del tratamiento con bleomicina, se realizó lavado bronquio-alveolar (LBA) en los ratones sacrificados después de un período de 7 días. Las células del LBA fueron separadas y teñidas con Wright-Giemsa y evaluadas por un patólogo, para contar el porcentaje de macrófagos, linfocitos, eosinófilos y basófilos en el LBA. Como se muestra en la figura 9 el porcentaje de neutrófilos fue significativamente mayor en los ratones MMP-19 +/+ comparado con los ratones MMP-19 -/- ( $10.80 \pm 9.42$  vs  $1.20 \pm 1.79$   $p < 0.01$ , respectivamente)

A los 7 días de evolución del modelo se sacrificaron los ratones, llevando a cabo un conteo diferencial de células en lavados bronquio alveolares (LBA) para evaluar que tipos celulares se presentaban en la etapa inflamatoria.

Como se muestra en la figura 9 el porcentaje de neutrófilos fue significativamente mayor en los ratones MMP-19 +/+ comparado con los ratones MMP-19 -/- ( $10.80 \pm 9.42$  vs  $1.20 \pm 1.79$   $p < 0.01$ , respectivamente).

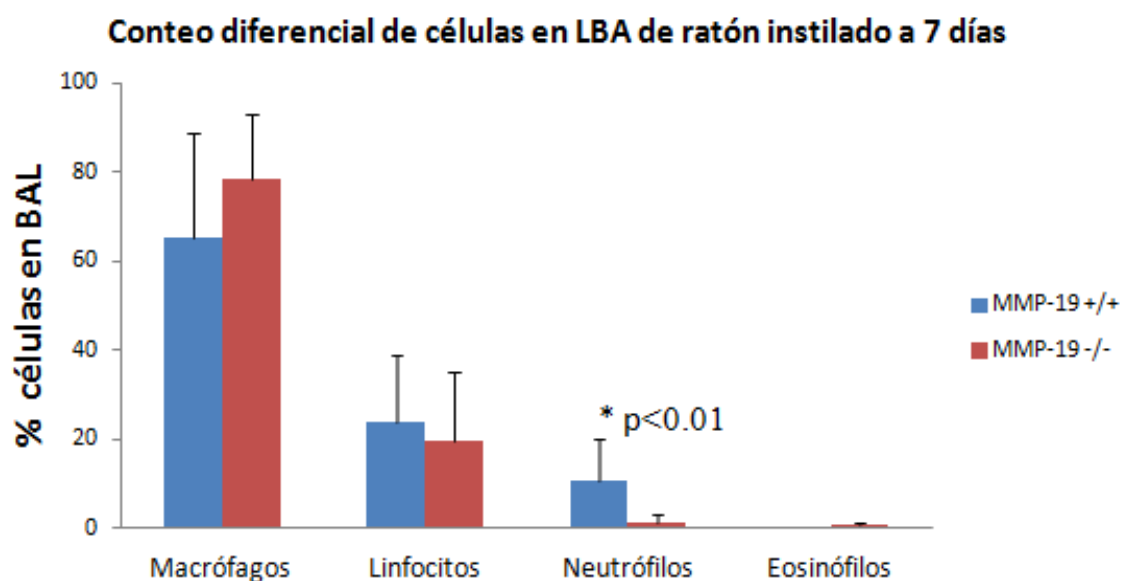


Figura 9. Conteo diferencial celular en LBA en ratones MMP-19 +/+ y MMP-19 -/-.

**Expresión de colágena  $\alpha$ - tipo I (Col 1 $\alpha$ 1) en pulmones control e instilados a 7 y 21 días.**

Se cuantificó la expresión de colágena  $\alpha 1$  tipo I por medio de PCR en tiempo real en el pulmón de ratones controles e instilados con bleomicina, sacrificados a los 7 y 21 días. Los pulmones de ratones, instilados con solución salina, no presentaron diferencias significativas. En los pulmones instilados a 21 días se presentó un incremento en la expresión de Col1 $\alpha$ 1 expresión con respecto a su control en ambos genotipos, cabe recalcar que se encontró una mayor expresión de Col1 $\alpha$ 1 en los ratones MMP-19 -/- comparación con los MMP-19+/+ (MMP-19+/+  $0.001128 \pm 0.000149$  vs MMP-19 -/-  $0.01491 \pm 0.000555$   $p < 0.01$ ). Figura 10.

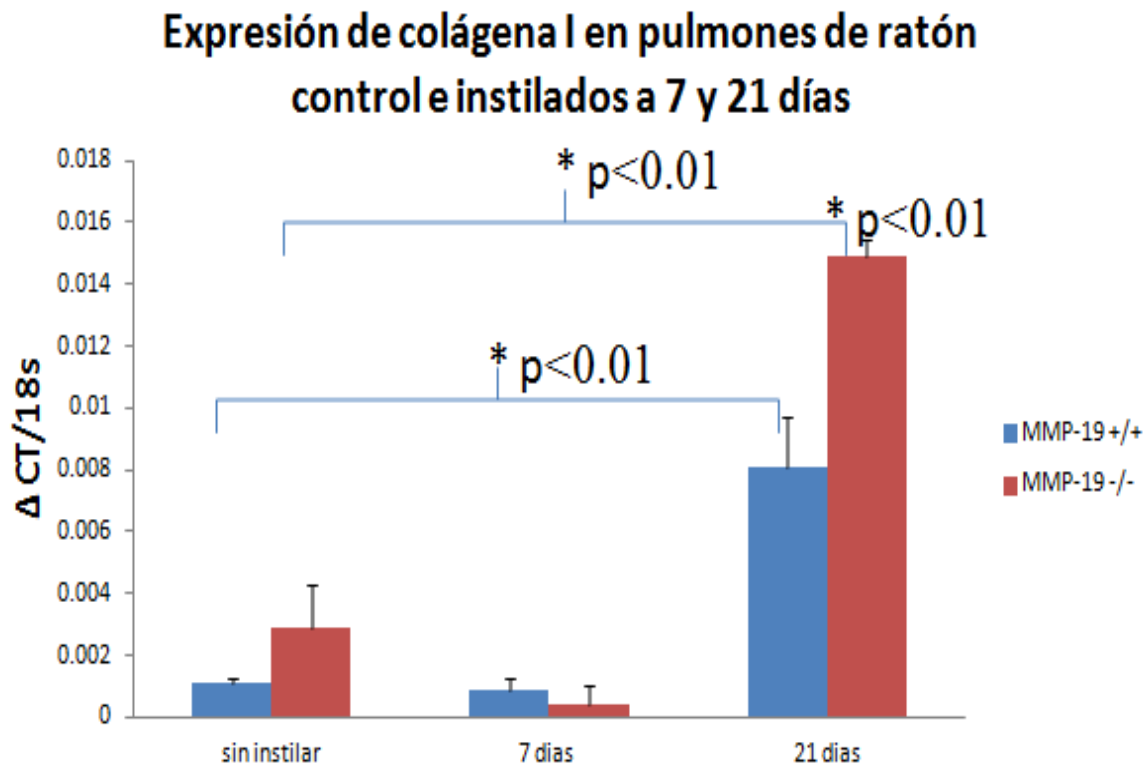


Figura 10. Expresión de colágena 1 $\alpha$ 1 en pulmones controles e instilados con bleomicina a 7 y 21 días por el método  $\Delta$ cT. Los resultados se presentan como promedio con desviación estándar de tres pulmones por genotipo en cada punto.

#### Expresión de PPAR- $\gamma$ 1 en pulmones instilados con bleomicina

Al comparar los pulmones MMP-19 +/+ y MMP-19-/- instilados con solución salina podemos observar que los ratones MMP-19-/- presentan una expresión significativamente mayor de PPAR- $\gamma$ 1 comparados con los ratones MMP-19 +/+ (MMP-19+/+  $3.31E-06 \pm 1.41E-07$  vs MMP-19 -/-  $1.89E-05 \pm 3.89E-07$   $p < 0.01$ ).

En el caso de los ratones MMP-19+/+ la expresión de PPAR- $\gamma$ 1 disminuyó significativamente a los 7 días post-instilación y posteriormente alcanzó los niveles basales a los 21 días post-instilación. En el caso de los ratones MMP-19-/- la expresión de PPAR- $\gamma$ 1 disminuyó progresivamente a los 7 y 21 días (Figura 11)

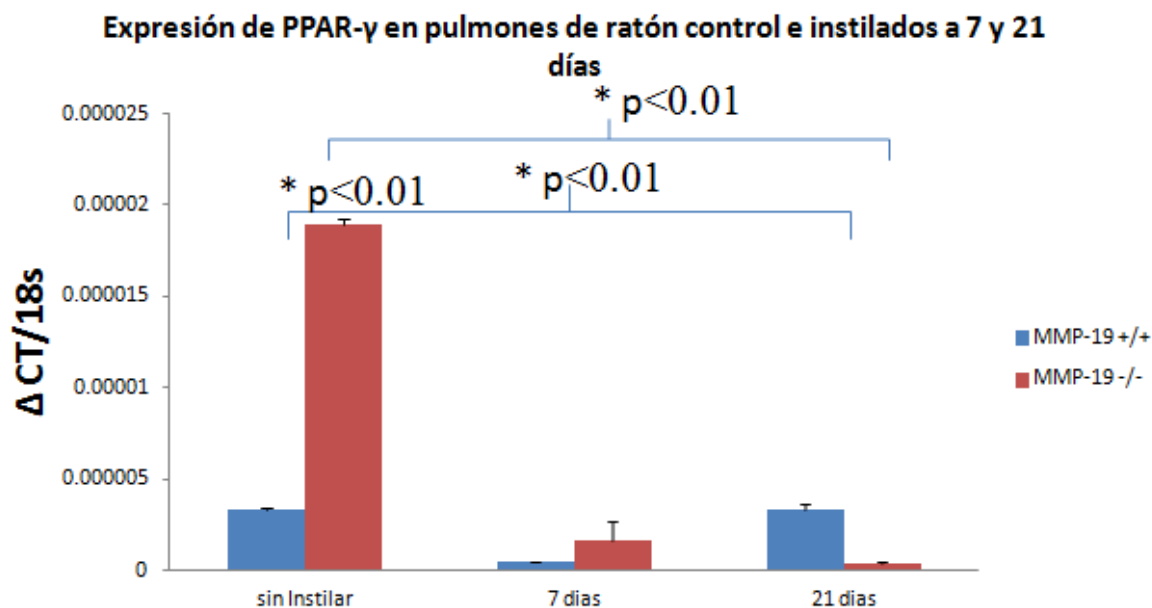


Figura 11. Expresión de PPAR- $\gamma$ 1 en pulmones controles e instilados con bleomicina a 7 y 21 días. Los resultados se presentan como promedio con desviación estándar de triplicados.

### Immunohistiquímica

Los ratones MMP-19 +/+ y MMP-19 -/- se sacrificaron por medio de una sobredosis de Pentobarbital sódico. Se obtuvieron los pulmones izquierdos para ser almacenados en nitrógeno líquido y el derecho se fijó con paraformaldehído y se embebió en parafina para análisis histológico e inmunohistoquímica.

Los ratones control fueron tratados con solución salina vía intratraqueal. No se encontraron diferencias morfológicas en el pulmón de los ratones MMP-19 +/+ y MMP-19-/-, ni antes ni después del tratamiento con solución salina, así como tampoco en cuanto a la expresión de PPAR- $\gamma$  entre MMP-19 +/+ y MMP-19-/- como se puede apreciar en la figura 12 (A y B) y 13 (A y B).

A los 7 días postinstilación podemos observar varias células positivas para PPAR- $\gamma$  en el pulmón de ratones de ambos genotipos MMP-19 +/+ y MMP-19 -/- (figura 12), un aumento nos permite observar macrófagos alveolares propios de una etapa inflamatoria. Sin embargo no se aprecian diferencias entre ambos genotipos, ni en la expresión de PPAR- $\gamma$ , ni en la morfología del pulmón (Figuras 12C/D y 13C/D). Cabe recalcar que al realizar el LBA si se encontraron diferencias significativas entre estos grupos de ratones ya que los MMP-19+/+ presentan un mayor número de neutrófilos que los MMP-19 -/- (Figura 9).

A los 21 días post instilación con bleomicina se observaron áreas de fibrosis en ambos ratones pero un mayor daño y extensión de la fibrosis en los ratones MMP-19 -/-. Podemos apreciar pocas células positivas para PPAR- $\gamma$ , además de una tinción tenue, las células se identificaron como macrófagos alveolares, también sin mostrar diferencias de expresión PPAR- $\gamma$  entre ambos genotipos figura 12 (E y F) y 13 (E y F).

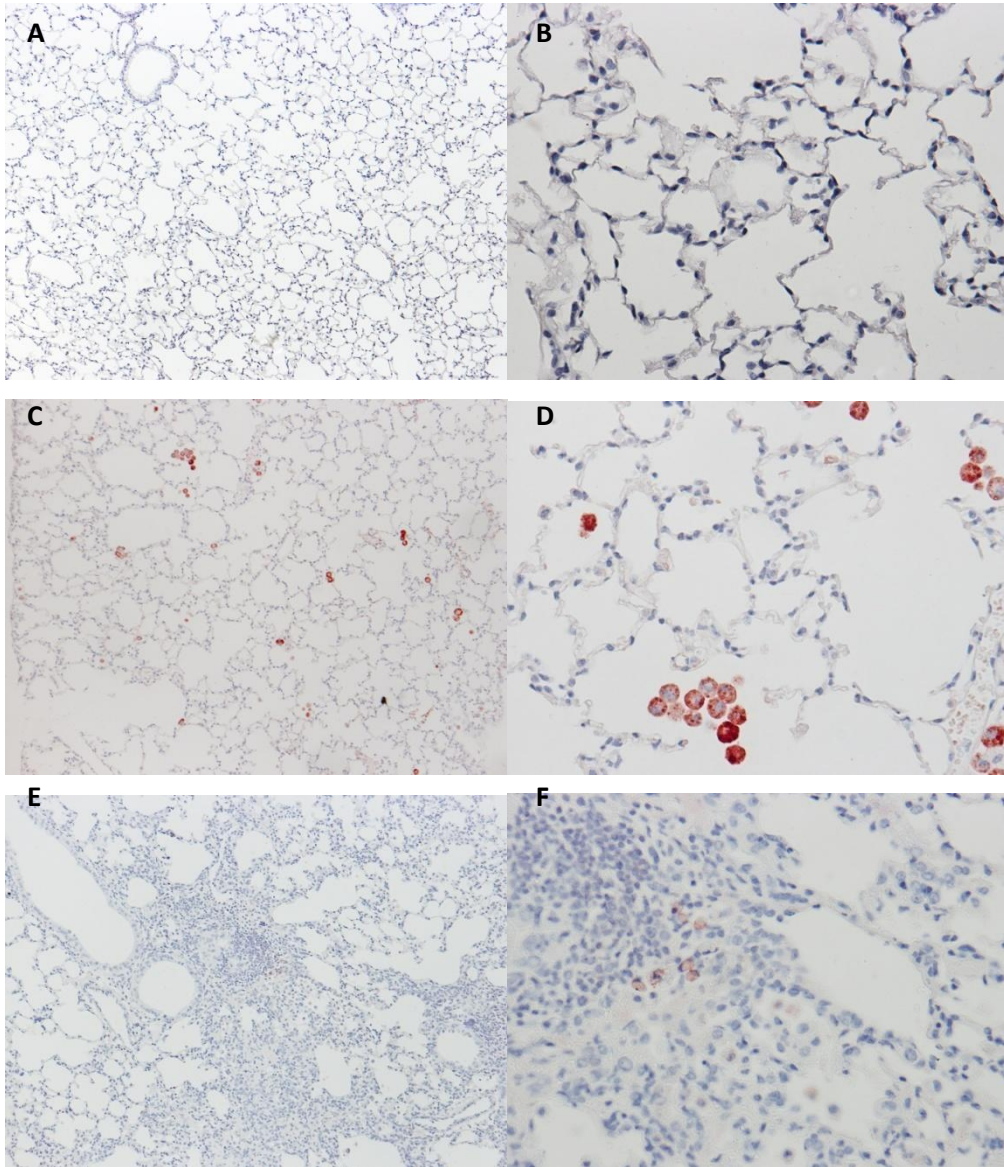


Figura 12. Inmunohistoquímica de pulmones MMP-19 +/+ con el anticuerpo de PPAR- $\gamma$ 1 control (**A** 10x y **B** 40x), instilados a 7 días (**C** 10x y **D** 40x) e instilados a 21 (**E** 10x y **F** 40x).

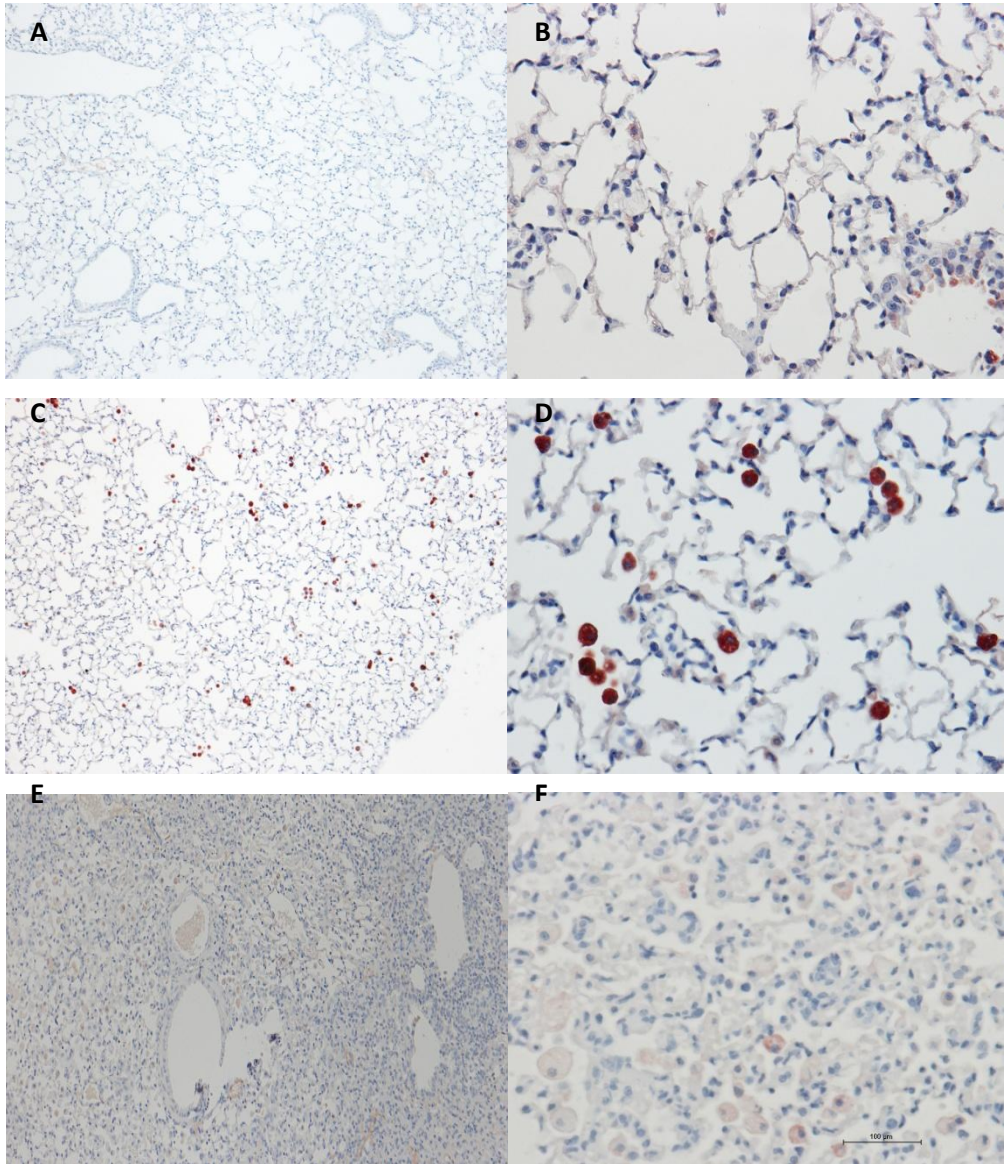


Figura 13. Inmunohistoquímica de pulmones MMP-19 <sup>-/-</sup> con el anticuerpo de PPAR- $\gamma$ 1. Control (**A** 10x y **B** 40x), instilados a 7 días (**C** 10x y **D** 40x) e instilados a 21 (**E** 10x y **F** 40x).

## Expresión de colágena en fibroblastos

Se realizó una curva tiempo/respuesta para determinar el tiempo en el cuál se obtenía la expresión máxima de colágena en condiciones basales y bajo el estímulo de TGF- $\beta$ 1.

### Expresión de colágena en fibroblastos MMP-19 +/+ y MMP-19 -/-

La expresión de colágena se midió con sondas Taqman específicas para colágena 1 $\alpha$ 1 de ratón (*Mus musculus Col1a1*) y se evaluó en fibroblastos extraídos del pulmón de ratones MMP-19 +/+ y MMP-19 -/- cultivados 24hrs con TGF- $\beta$ 1.

Inicialmente se analizó la expresión a las 3, 6, 12 y 24 horas para encontrar el punto óptimo de estimulación con TGF- $\beta$ 1. Como se muestra en la figura 13, determinamos que el período de máxima expresión de colágena después del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 es a las 24h. Interesantemente la inducción de la expresión de colágena fue significativamente mayor en los fibroblastos deficientes en MMP19, en comparación con los MMP-19+/, tanto en condiciones control, como en presencia de TGF- $\beta$ 1, como se observa en la figura 14.

**Curva de expresión de colágena en fibroblastos  
MMP-19 +/+ y MMP-19 -/-**

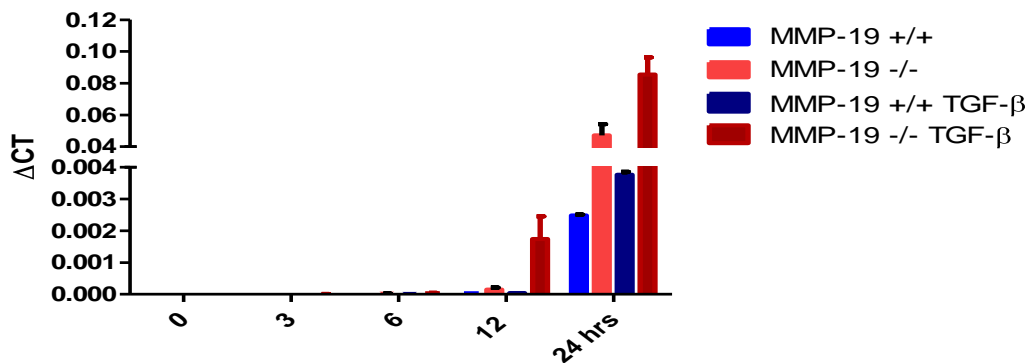


Figura 14. Curva Tiempo/ respuesta de expresión de colágena en fibroblastos MMP-19 +/+ y MMP-19 -/- control y con el estímulo de TGF- $\beta$  a 0, 3, 6, 12 y 24horas. Representada como promedio con desviación estándar por el método de  $\Delta$ CT.



Basados en el experimento anterior se montó un experimento en fibroblastos cultivados por 24 horas con diferentes estímulos que incluyen: TGF- $\beta$ , los dos tipos de agonistas del PPAR- $\gamma$  15dPGJ2 y rosiglitazona, TGF- $\beta$ /15dPGJ2, TGF- $\beta$ /rosiglitazona además de fibroblastos sin estímulo (control) para cada genotipo.

Como se observa en la figura 15 los fibroblastos control (sin estímulo) MMP-19<sup>-/-</sup> presentan una expresión significativamente mayor de colágena en comparación con los fibroblastos MMP-19<sup>+/+</sup>. Al estimular los fibroblastos, de ambos genotipos, con TGF- $\beta$  observamos un aumento significativo de la expresión de colágena, en comparación con sus controles, sin dejar de lado que los ratones MMP-19<sup>-/-</sup> presentan una mayor expresión basal de colágena  $\alpha$  1 tipo I que los MMP-19<sup>+/+</sup>. Al estimular con el agonista natural de PPAR- $\gamma$  15dPGJ2, los fibroblastos MMP-19<sup>+/+</sup> no presentaron diferencias de expresión en comparación con su control, aunque en el caso de los fibroblastos MMP-19<sup>-/-</sup> se encontró una disminución de la expresión de colágena, inclusive menor a la de su control, sin embargo entre los genotipos MMP-19<sup>+/+</sup> y MMP-19<sup>-/-</sup> se sigue conservando la diferencia descrita previamente, es decir, una mayor expresión de colágena en los MMP-19<sup>-/-</sup>.

Un comportamiento similar se encontró al estimular con el agonista sintético rosiglitazona, en el cual los fibroblastos MMP-19<sup>+/+</sup> mostraron diferencias significativas en comparación con su control, sin embargo los fibroblastos MMP-19<sup>-/-</sup> presentaron un menor nivel de expresión de colágena, en comparación con su control.

Los fibroblastos MMP-19<sup>+/+</sup> que fueron estimulados con 15dPGJ2 10 $\mu$ M/ y o en combinación con TGF- $\beta$ 1 3ng/ml presentaron una disminución significativa en la expresión de colágena, en comparación con los fibroblastos MMP-19<sup>+/+</sup> que solo fueron estimulados con TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, aún presentan una expresión mayor que sus controles, en el caso de los fibroblastos MMP-19<sup>-/-</sup> con el mismo estímulo también presentan una disminución en la expresión de colágena en comparación con los

fibroblastos MMP-19  $-/-$  estimulados con TGF- $\beta$ 1, en comparación con su control estos fibroblastos también presentan una expresión significativamente mayor de colágena.

En el caso del estímulo con Rosiglitazona 10 $\mu$ M + TGF- $\beta$ 1 3ng/ml, los fibroblastos MMP-19  $+/+$  presentan una disminución significativa de colágena en comparación con los fibroblastos MMP-19 $+/+$  estimulados sólo con TGF- $\beta$ 1, sin embargo tienen una mayor expresión que su control. Por otro lado, los fibroblastos MMP-19  $-/-$  estimulados con Rosiglitazona 10 $\mu$ M/TGF- $\beta$ 1 3ng/ml también presentan una disminución en la expresión de colágena en comparación con los fibroblastos MMP-19  $-/-$  estimulados solo con TGF- $\beta$ 1, manteniendo una mayor expresión de colágena que su control. Figura 15.

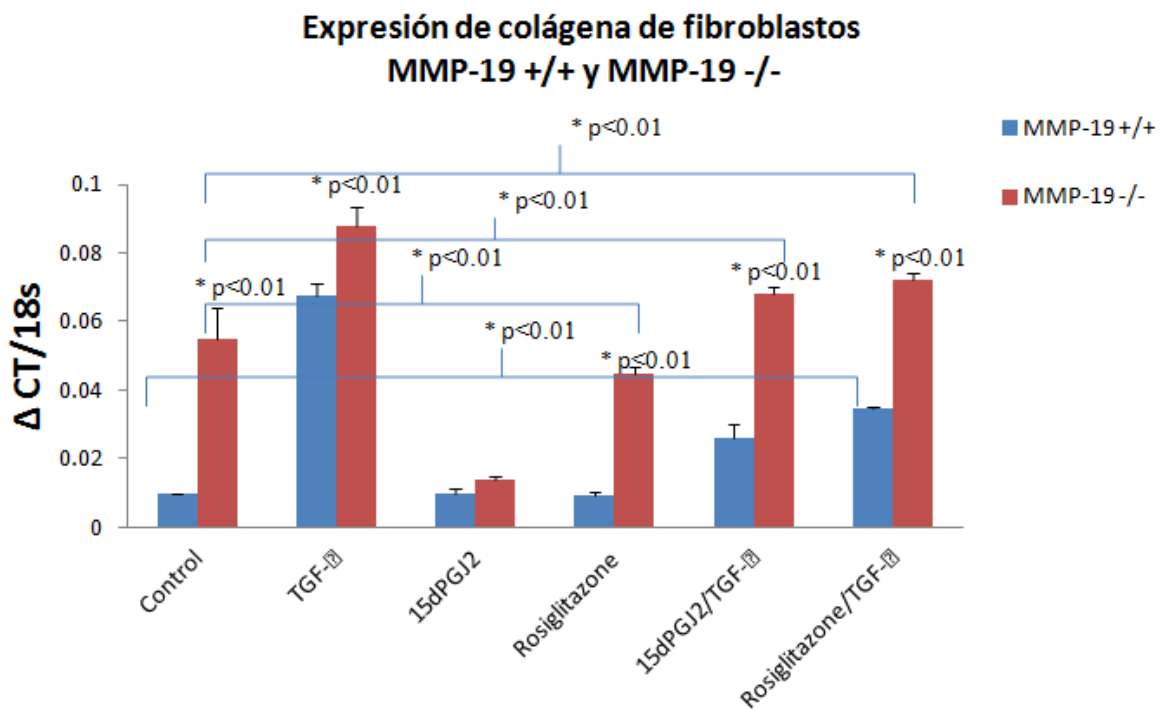


Figura 15. Expresión de colágena 1 $\alpha$ 1 en fibroblastos de ratón MMP-19 $+/+$  y MMP-19 $-/-$  calculada por el método de  $\Delta$ Ct y representada en promedio y desviación estándar. Los fibroblastos fueron cultivados por 24 hrs en las siguientes condiciones: Control (sin estímulo), TGF- $\beta$  3ng/ml, 15dPGJ2 10 $\mu$ M, Rosiglitazona 10 $\mu$ M, 15dPGJ2 10 $\mu$ M/ TGF- $\beta$  3ng/ml y Rosiglitazona 10 $\mu$ M/TGF- $\beta$  3ng/ml.

**Efecto de agonistas del PPAR- $\gamma$ 1 en la expresión y síntesis de colágena en fibroblastos de pulmón de ratón MMP-19 +/+ y MMP-19 -/-.**

El efecto del TGF- $\beta$ 1 y de los agonistas en la síntesis de colágena de los fibroblastos MMP-19 +/+ y MMP-19 -/- fue analizado a nivel de proteína, utilizando un método colorimétrico, usando el reactivo de Sircol (Biocolor UK). Observamos una mayor tasa de síntesis de colágena en los fibroblastos MMP-19 -/- en comparación con los fibroblastos MMP-19 +/+ en condiciones basales o control (sin ningún estímulo). En el caso de los fibroblastos que fueron estimulados con TGF- $\beta$ 1, observamos un aumento significativo de la síntesis de colágena en ambos genotipos con respecto a su control sin estímulo, sin embargo no encontramos diferencias significativas al comparar entre genotipos. Por otro lado, al estimular las células con los agonistas 15dPGJ2 y Rosiglitazona no se encontraron diferencias con respecto de sus controles. Sin embargo, al combinar los estímulos de los agonistas con el TGF- $\beta$  (15dPGJ2/TGF- $\beta$ 1 y Rosiglitazona/TGF- $\beta$ 1) se aprecia una disminución de la síntesis de colágena en ambas combinaciones en comparación con su estímulo de TGF- $\beta$ 1 solo, para cada genotipo. Figura 16.

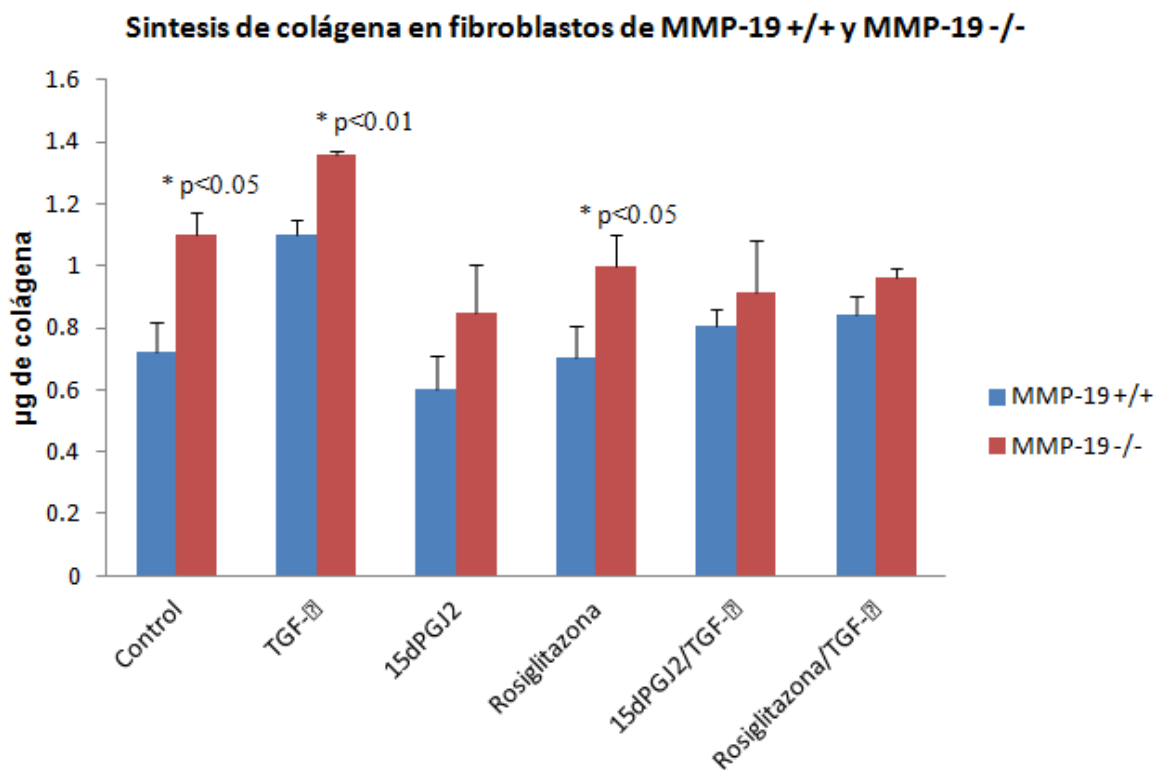


Figura 16. Promedio y desviación estándar de síntesis de colágena en fibroblastos MMP-19 +/+ y MMP-19 -/- cultivados por 48hrs en las siguientes condiciones: Control (sin estímulo), TGF-β 3ng/ml, 15dPGJ2 10µM, Rosiglitazona 10µM, 15dPGJ2 10µM/ TGF-β 3ng/ml y Rosiglitazona 10µM/TGF-β 3ng/ml.

### Expresión de PPAR-γ1 en fibroblastos MMP-19 +/+ y MMP-19 -/-

La expresión de PPAR-γ1 en los fibroblastos control (sin estímulo) MMP-19 +/+ y MMP-19 -/- no presento diferencias significativas. Al estimular a los fibroblastos MMP-19 +/+ con TGF-β1 observamos que la expresión de PPAR-γ disminuye significativamente, al comparar con los niveles del control; por el contrario, la expresión de PPAR-γ aumenta significativamente en los fibroblastos MMP-19 -/- por encima del nivel de expresión de los fibroblastos control.

Respecto al tratamiento con 15dPGJ2, observamos que la expresión de PPAR- $\gamma$  en los fibroblastos MMP-19 +/+ , no se modificó con el tratamiento del agonista respecto al nivel de expresión en los fibroblastos control o no estimulados.

Por el contrario, el tratamiento con el agonista en los fibroblastos MMP-19 -/- indujo un aumento significativo en la expresión de PPAR- $\gamma$ , en comparación con su propio control, y con los fibroblastos MMP-19+/+ estimulados.

Por otro lado, los MMP-19 -/- presentan un aumento en la expresión del receptor en comparación con su control y con el MMP-19 +/+ con el agonista natural.

En el caso de los fibroblastos estimulados con el agonista sintético Rosiglitazona los fibroblastos MMP-19 +/+ no presentan diferencias en la expresión del receptor, en comparación con su propio control, pero si con los fibroblastos MMP-19 -/- estimulados con el mismo agonista, los cuales presentaron un aumento significativo de expresión del PPAR- $\gamma$ 1 en comparación con su propio control.

De la misma manera que en experimentos pasados se evaluó el efecto que tenía la combinación de estímulos. En el caso de 15dPGJ2 10 $\mu$ M/ TGF- $\beta$  3ng/ml los fibroblastos MMP-19 +/+ presentaron un aumento en la expresión del receptor en comparación con su control, sin embargo éste no fue significativo, los fibroblastos MMP-19 -/- también presentaron un aumento en cuanto a la expresión de PPAR $\gamma$ 1 en comparación con su control y con los fibroblastos MMP-19 +/+ con el mismo estímulo.

Respecto a la combinación Rosiglitazona 10 $\mu$ M/TGF- $\beta$  3ng/ml, los fibroblastos MMP-19 +/+ presentaron un aumento significativamente mayor en la expresión de PPAR- $\gamma$ 1 en comparación con su control, sin embargo este aumento no fue mayor que en los fibroblastos MMP-19-/- bajo las mismas condiciones. Los fibroblastos MMP-19 -/- también mostraron un aumento significativamente mayor que su control. Figura 17.

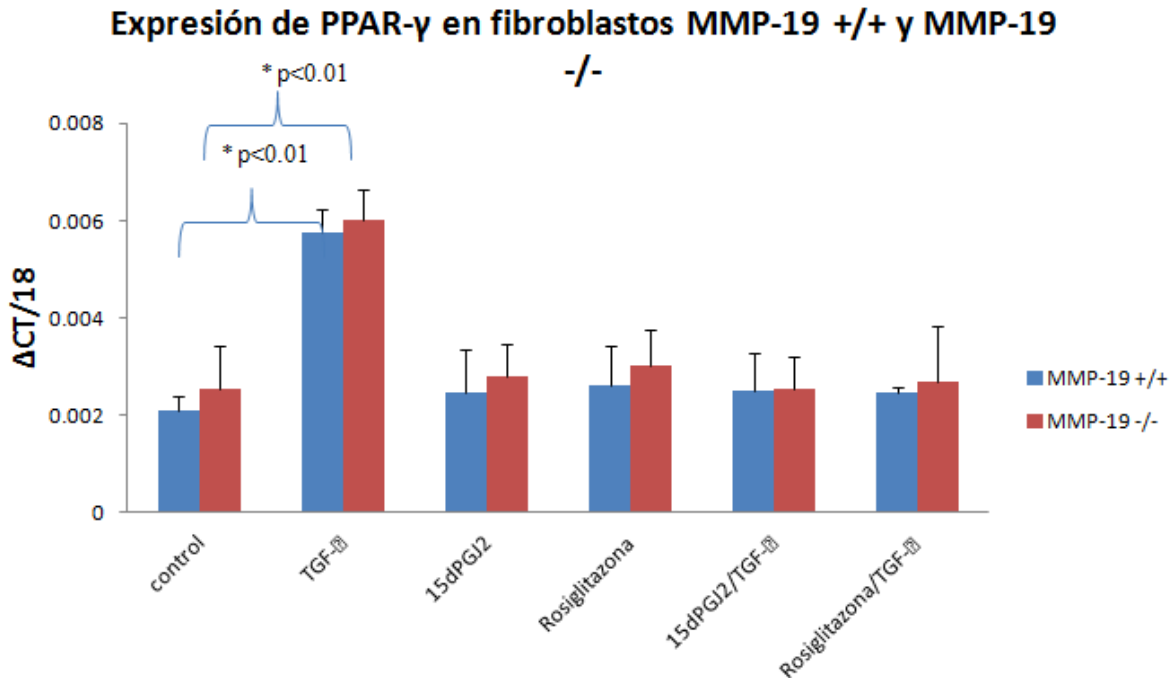


Figura 17. Expresión de PPAR- $\gamma$ 1 en fibroblastos de ratón MMP-19+/+ y MMP-19-/- calculada por el método de  $\Delta$ Ct y representada en promedio y desviación estándar. Los fibroblastos fueron cultivados por 24 hrs en las siguientes condiciones: Control (sin estímulo), TGF- $\beta$  3ng/ml, 15dPGJ2 10 $\mu$ M, Rosiglitazona 10 $\mu$ M, 15dPGJ2 10 $\mu$ M/ TGF- $\beta$  3ng/ml y Rosiglitazona 10 $\mu$ M/TGF- $\beta$  3ng/ml.

## Discusión

La fibrosis pulmonar idiopática es la más común y agresiva entidad de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (FP) para la cual no existe tratamiento. Es una enfermedad relacionada con la edad, ya que la presentan personas de entre los 55-75 años de edad, es crónica, progresiva, irreversible y letal; debido a que una vez que el paciente es diagnosticado con FPI su esperanza de vida es de 2.5-3.5 años. En la actualidad existen suficientes evidencias de que la respuesta fibrótica se debe a una activación anormal de las células del epitelio alveolar y no a un proceso crónico inflamatorio como en el resto de las enfermedades fibrosantes. Esta respuesta anormal produce mediadores para la formación de focos de fibroblastos y miofibroblastos, así como, la proliferación de

las células mesenquimales residentes, activación de fibrocitos circulantes y la estimulación de TEM. Los fibroblastos y miofibroblastos tienen una exagerada secreción de colágenas, lo que resulta en el depósito exagerado de moléculas de la MEC en el parénquima pulmonar, así como, la pérdida de la arquitectura y función del pulmón (1, 2, 4).

La FPI es una enfermedad de origen desconocido y por ello es difícil que un modelo experimental reproduzca esta enfermedad. Actualmente los hallazgos más relevantes provienen de modelos experimentales realizados en animales, entre los métodos utilizados para inducir fibrosis experimental se incluyen; la instilación directa a la tráquea de un agente fibrogénico como asbesto, sílice y bleomicina (la cual se utilizó en éste trabajo por tratarse del modelo más popular en ratones) (3, 61).

La Bleomicina es un glicopéptido utilizado en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, sin embargo el potencial terapéutico de este medicamento está limitado debido a la toxicidad pulmonar que presenta. El efecto citotóxico es dosis/dependiente e involucra el desarrollo de neumonitis la cual progresa a fibrosis pulmonar. Las células epiteliales alveolares son el blanco principal del daño inducido por bleomicina, la cual ejerce su efecto citotóxico a través de la generación de especies reactivas de oxígeno y por daño directo al DNA y RNA, además de liberar citocinas y factores de crecimiento que participan como quimio atrayentes de células inflamatorias y fibroblastos (60, 61).

Los animales transgénicos son de gran utilidad para determinar la función de genes específicos, no solo en patologías humanas sino también en la homeostasis de los organismos. Para la realización de este trabajo se trabajó con un ratón transgénico deficiente de la MMP 19 (MMP-19) ó RASI-I, MMP-19 -/-) para evaluar el papel de esta enzima y su relación con el PPAR- $\gamma$ 1 en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, siguiendo el modelo en un periodo de 7 y 21 días post-instilación.

Se llevo a cabo un conteo diferencial celular en LBA donde se comprobó que los pulmones instilados a 7 días de ratones MMP-19 +/+ tienen diferencias en la inflamación, ya que presentan un mayor número de neutrofilos que los MMP-19-/-, lo cual nos podría hacer

pensar que la fibrosis pulmonar más extensa y severa que presentan los ratones MMP-19<sup>-/-</sup> sea independiente de una vía inflamatoria, al igual que lo propuesto por nuestro grupo de trabajo en el caso de la FPI (2, 3, 4, 41).

Al analizar la expresión de la Col I $\alpha$ 1 en los pulmones de ratones MMP-19<sup>+/+</sup> y MMP-19<sup>-/-</sup>, se observó que los pulmones MMP-19<sup>-/-</sup> tienen una mayor expresión de colágena. Los pulmones instilados a 21 días mostraron un aumento de poco más de tres veces la expresión de colágena I $\alpha$ 1 en comparación con sus controles. En ambos genotipos instilados a 21 días los pulmones MMP-19<sup>-/-</sup> tienen una mayor expresión de colágena en comparación con el MMP-19<sup>+/+</sup>, lo cual coincide con lo antes observado en el análisis histopatológico donde se observó una fibrosis más severa en los pulmones MMP-19<sup>-/-</sup>. Este resultado coincide con lo reportado por nuestro grupo de trabajo que demostró que después de la instilación con bleomicina los pulmones de ratones MMP19<sup>-/-</sup> tienen un contenido de hidroxiprolina significativamente mayor que el ratón MMP-19<sup>+/+</sup> (41)

Se requieren estudios posteriores para analizar el papel de la MMP-19 en la regulación de la colágena I no solo en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, pues como ya se menciono en condiciones basales los pulmones de los ratones MMP-19<sup>-/-</sup> presentan una mayor expresión de col I $\alpha$ 1.

Para averiguar si el grado de fibrosis en los ratones MMP-19<sup>-/-</sup> estaba relacionado con la expresión de PPAR- $\gamma$ 1 se analizó la expresión de este receptor en los pulmones control e instilados a 7 y 21 días en ambos genotipos. La expresión basal de los pulmones MMP-19<sup>+/+</sup> fue significativamente menor en comparación con los pulmones MMP-19<sup>-/-</sup>. Estos datos van en contra de nuestra hipótesis inicial acerca de que el ratón MMP-19<sup>-/-</sup> tenía una disminución de PPAR- $\gamma$ 1 y por ello puede contribuir a una respuesta fibrosante más severa. Sin embargo, en condiciones basales este aumento en la expresión puede estar relacionado con la obesidad y atrofia de adipocitos presentada por estos ratones (21) y no con el proceso fibrótico. Conforme avanza el modelo de bleomicina se observa que hay una disminución drástica del PPAR- $\gamma$ 1 en los pulmones MMP-19<sup>-/-</sup> instilados a 7 y a 21



días se presenta una disminución significativa en comparación con los pulmones MMP-19 +/+ . La disminución drástica de la expresión del receptor en los pulmones MMP-19 -/- hace suponer que el PPAR- $\gamma$ 1 tenga un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis en el organismo transgénico y tal vez la falta de la MMP-19 tenga que ver con el mantenimiento de la expresión del PPAR- $\gamma$ 1 durante el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

El análisis por inmunohistoquímica de la presencia de PPAR- $\gamma$  en pulmones control instilados con solución salina en los ratones MMP-19+/+ y MMP-19 -/- no mostró diferencias entre ambos grupos de ratones. Este resultado difiere de los resultados de expresión de PPAR- $\gamma$  analizados por PCR donde se observó una mayor expresión de PPAR- $\gamma$ 1 en los pulmones MMP-19-/-.

En los pulmones instilados a 7 días, muestran un gran infiltrado de macrófagos alveolares con marca positiva al anticuerpo de PPAR- $\gamma$ 1 en ambos genotipos. Cabe recalcar que se ha reportado que el PPAR- $\gamma$ 1 como factor de transcripción de un gran número de genes, participa en la diferenciación de Monocito- Macrófago (62).

En la etapa fibrótica del modelo (21 días), se observó también un infiltrado de macrófagos alveolares positivos al anticuerpo de PPAR- $\gamma$  sin embargo no se encontraron diferencias de expresión de este receptor nuclear entre ambos genotipos. Dato que no coincide con lo encontrado por medio de PCR, donde se observó una menor expresión de PPAR- $\gamma$ 1 en los pulmones MMP-19-/- . Cabe recalcar que en cuanto al grado y extensión de la fibrosis si se encontraron diferencias ya que se puede apreciar una fibrosis extensa y severa en los pulmones MMP-19-/-, lo que coincide con lo reportado por el grupo de trabajo, donde se demostró que la MMP-19 tiene un papel antifibrotico en el desarrollo de la fibrosis pulmonar (41).

Los fibroblastos son las células responsables de la síntesis de colágena fibrilar y en este contexto decidimos analizar el comportamiento de fibroblastos obtenidos de los pulmones de los ratones MMP-19 +/+ y MMP-19 -/- de la MMP19. En condiciones basales

los fibroblastos MMP-19  $-/-$  sintetizan una mayor cantidad de colágena en comparación de los fibroblastos MMP-19  $+/+$ . La acumulación excesiva de moléculas de la MEC es una característica de las enfermedades fibrosantes como la fibrosis pulmonar, entre las moléculas de la MEC más expresadas en la fibrosis pulmonar se encuentra la colágena I la cual contribuye al fenotipo fibrótico de estos ratones MMP-19  $-/-$  y se requieren estudios posteriores para analizar su posible papel regulador de la síntesis de colágena tipo I.

La estimulación de los fibroblastos de pulmón de ambos genotipos con TGF- $\beta$ , se observó un incremento en la síntesis de colágena, conservado una mayor síntesis por parte de los MMP-19  $-/-$ . Al estimular los fibroblastos con el agonista natural 15dPGJ2 se observa una leve disminución en ambos genotipos en comparación con sus respectivos controles, esta disminución no llega a ser significativa ni entre sus controles ni entre los genotipos. Al estimular las células MMP-19  $+/+$  con el agonista sintético rosiglitazona estas no presentaron prácticamente ninguna diferencia con su control, sin embargo si presentaron diferencias significativas con respecto a las MMP-19  $-/-$  las cuales presentaban una mayor síntesis de colágena. Al agregar la combinación de los agonistas con el TGF- $\beta$  la síntesis de colágena disminuye al nivel de sus controles (Figura 15). Por lo tanto, pensamos que la MMP-19 no está relacionada con el efecto de los agonistas sobre la síntesis de colágena, aunque, ya mencionamos que probablemente la MMP-19 juega un papel importante en el mantenimiento de la expresión del PPAR- $\gamma$ . Los efectos “anti- fibroticos” del PPAR- $\gamma$ 1 no están del todo relacionados con el receptor, pues varios autores han demostrado que muchos de estos efectos son el resultado de sus ligandos tanto naturales sintéticos por medio de una vía independiente al PPAR- $\gamma$ 1, ya sea bloqueando la vía de AKT3 o algunas otras rutas o formas aún no elucidadas (53, 54, 55, 56, 57, 58, 60). Es bastante interesante que los fibroblastos MMP-19 $-/-$  presenten mayor síntesis de colágena en condiciones basales que los MMP-19  $+/+$ , inclusive, el dato fue corroborado mediante PCR en tiempo real, se realizó una curva de tiempo/expresión para montar el experimento de expresión de colágena con los mismos agonistas, y el experimento se realizó a las 24 hrs (Figura 13). Al medir la expresión de Col  $\alpha$ 1 de fibroblastos de ambos genotipos con los agonistas de

PPAR- $\gamma$ 1 se observó mayor expresión en los de MMP-19  $-/-$ . Por lo que se puede asegurar que los fibroblastos MMP-19  $-/-$  tienen una mayor tasa de expresión y síntesis de colágena.

La expresión del PPAR- $\gamma$ 1 en fibroblastos no mostró diferencias significativas entre los fibroblastos MMP-19  $+/+$  y MMP-19  $-/-$  al ser estimulados con los agonistas 15dPGJ2 y rosiglitazona, TGF- $\beta$ /15dPGJ2, TGF- $\beta$ /rosiglitazona, y prácticamente la expresión se mantuvo igual que sin ningún estímulo, pero al ser estimulados sólo con TGF- $\beta$  ambos genotipos presentan un aumento de expresión del PPAR- $\gamma$  significativamente mayor que sus respectivos controles, aunque no presentaron diferencias entre los genotipos, lo que podría deberse a que la MMP-19 no tiene que ver con la expresión del receptor..

## Conclusiones

Los ratones MMP-19  $-/-$  desarrollan una fibrosis más extensa y severa que los ratones MMP-19  $+/+$ .

Los pulmones MMP-19  $-/-$  tienen mayor expresión del gen de col  $\alpha 1$  que los MMP-19  $+/+$ .

Existe una disminución de PPAR- $\gamma 1$  en los pulmones MMP-19  $-/-$  instilados a 7 y 21 días en comparación con los pulmones MMP-19  $+/+$ .

No se encontraron diferencias en los tipos celulares y número de células que expresan el PPAR- $\gamma 1$  en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en los ratones MMP-19  $+/+$  y MMP-19  $-/-$ .

Los fibroblastos MMP-19  $-/-$  expresan y sintetizan más colágena que los MMP-19  $+/+$ .

## Bibliografía

- 1.-Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling. **Proc Am Thorac Soc**,3:383-388, 2006.
- 2.-Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. **Frontiers in Bioscience** 7:1743-1761, 2002.
- 3.-Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. **Ann Intern Med** 134:136-151, 2001.
- 4.-King T E, Pardo A, Selman M. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Lancet** 378:1949-1961, 2011.
- 5.-Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: and epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. **Respir Res** 3: 1-8, 2002.
- 6.-Pardo, A. La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. **Rev Inst Natl Enf Res Mex** 6: 156-164, 1993.
- 7.- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. Cell Junctions, cell adhesion and the extracellular matrix. **Molecular Biology of the Cell**. 4a ed. p. 949-1010. Garland Science, Nueva York & London, 2002
- 8.-Jiménez LF y Merchant H eds. Biología celular y molecular. 1ª ed. Capítulo Matriz Extracelular p. 515-540. **Pearson**, México 2003.
- 9.- Nagase H, Visse R and Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardio Res** 69: 5562-5563, 2006.
- 10.-Somerville R, Oblander S and Apte S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. **Gen Bio** 4: 216.1-216.11, 2003

- 11.- Perez-Tamayo R. Morphostasis: Regulation of Structure. *Bol Estud Med Biol* ,145–161, 1974.
- 12.- Fernandes D, Bonacci Stewart A. Extracellular Matrix, Integrins, and Mesenchymal Cell Function in the Airways. *Curr Drug Targets* 7 (5): 567-577, 2006.
- 13.- Visse R and Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *J Am Heart Asso* 92: 827-839, 2003.
- 14.-Brew K, Dinakarbandian D, Nagase N. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Bioch et Bioph* 1477: 267-283, 2000.
- 15.-Stetler-Stevenson W. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases In Cell Signaling: Metalloproteinase-independent Biological Activities. *Inst Nat Health*: 1-19, 2008.
- 16.-Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochem* 87: 249-263, 2005.
- 17.- Checa M, Ruiz V, Montaña M, Velázquez-Cruz R, Selman M, Pardo A. MMP-1 polymorphisms and the risk of idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet.* 124(5):465-72, 2008.
- 18.- Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, et al. Gene expresión profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am Jour Repir Crit Care Med.* 173, 188-198, 2006.
- 19.- García-Alvarez J, Ramirez R, Sampieri CL, Nuttall RK, Edwards DR, Selman M, Pardo A. Membrane type-matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Vasc Diffuse Lung Dis.* 23 (1), 13-21, 2006.
- 20.- - Ramírez G, Hagood JS, Sanders Y, Ramírez R, Becerril C, Segura L, Barrera L, Selman M, Pardo A. Absence of Thy-1 results in TGF- $\beta$  induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Lab Invest.* 91(8), 1206-1218, 2006.

- 21.-Penda's AM, Folgueras AR, Llano E, Caterina J, Frerard F, Rodríguez F, Astudillo A, Noel A, Birkedal-Hansen H, and López-Otín C. Diet-Induced Obesity and Reduced Skin Cancer Susceptibility in Matrix Metalloproteinase 19-Deficient Mice. ***Mol and Cell Biol*** 24: 5304-5313, 2004.
- 22.- Misung Jo and Thomas E. Curry, Jr. Regulation of Matrix Metalloproteinase-19 Messenger RNA Expression in the Rat Ovary. ***Biol Reprod***: 1796–1806, 2004.
- 23.-Kolb C, Mauch S, Hans- Hartmut P, Krawinkel U and Sedlacek R. The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid patient. ***Immuno Letters*** 57: 83-88, 1997.
- 24.-. Caterina J, Shi J, Kozak CA, Engler JA and Birkedal- Hansen H. Characterization, expression analysis and chromosomal mapping of mouse Matrix Metalloproteinase-19 (MMP-19). ***Mol Biol Reprod*** 27: 73–79, 2000.
- 25.-Kolb C, Mauch S, Krawinkel U, and Sedlacek R. Matrix Metalloproteinase-19 in Capillary Endothelial Cells: Expression in Acutely, but Not in Chronically, Inflamed Synovium. ***Exp Cell Res*** 250: 122–130, 1999.
- 26.-Impola U, Toriseva M, Suomela S, Jeskanen L, Hieta N, Jahkola T, Grenman R, Kahari V and Saarialho-Kere U. Matrix Metalloproteinase-19 is Expressed by Proliferating Epithelium but Disappears with Neoplastic Dedifferentiation. ***Inst J Cancer*** 103: 709–716, 2003.
- 27.-Pendas AM, Knaupers V, Puente XS, Llano E, Matteii MG, Apte S, Murphys G, and López-Otín C. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. ***J Biol Chem*** 272, 4281–4286,1997.
- 28.-Mauch S, Kolb C, Kolb B, Sadowski T, and Sedlacek R. Matrix Metalloproteinase-19 Is Expressed in Myeloid Cells in an Adhesion-Dependent Manner and Associates with the Cell Surface. ***J Inmuno*** 168: 1244–1251, 2002.

- 29.- Sedlacek R, Mauch S, Kolb B, Schätzlein C, Eibel H, Peter HH, Schmitt J, Krawinkel U. Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis. *Immuo Biol* 198(4):408-23. 1998
- 30.- Bister VO, Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Uria J, Lohi J, Puolakkainen P, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere U. Differential expression of three matrix metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in normal and inflamed intestine and colon cancer. *Dig Dis Sci.*;49(4):653-61, 2004.
- 31.- Mauch C. Matrix Metalloproteinase-19:What Role Does this Enzyme Play in Wound Healing?. *J Inves Derma*: xix-xx, 2003.
- 32.-Beck IM, Ruckert R, Brandt K, Mueller MS, Sadowski T, Brauer R, Schirmacher P, Mentlein R, Sedlacek R. MMP19 Is Essential for T Cell Development and T Cell- Mediated Cutaneous Immune Responses. *PLoS ONE* 3: 1-11, 2008.
- 33.-Gruber HE, Ingram JA, Hanley EN Jr. Immunolocalization of MMP-19 in the human intervertebral disc: implications for disc aging and degeneration. *Biotech Histochem* 80, 157- 162, 2005.
- 34.-Mysliwy J, Dingley AJ, Sedlacek R, Grötzinger J. Structural characterization and binding properties of the hemopexin-like domain of the matrixmetalloproteinase-19. *Prot Express Purif* 46: 406–413, 2006.
- 35.-Hieta N, Impola U, López-Otín C, Saarialho-Kere U, and KahariawVM. Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Dermal Wounds and by Fibroblasts in Culture. *J Inves Derma* 121:997-1004, 2003.
- 36.-Stracke JO, Fosang AJ, Lastb K, Mercurib FA, Pendas AM, Llano E, Perrisd R, Di Cesare PE, Murphya G, Knauper V. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Letters* 478: 52-56, 2000.



- 37.-Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendas AM, Smithi B, López-Otin C, Murphy G, and Knauper V. Biochemical Characterization of the Catalytic Domain of Human Matrix Metalloproteinase 19: Evidence for a Role as a Potent Basement Membrane Degrading Enzyme. *J Biol Chem* 275: 14809-14816, 2000.
- 38.-Titz B, Dietricha S, Sadowskia S, Becka C, Petersenb and Sedlaceka R. Activity of MMP-19 inhibits capillary-like formation due to processing of nidogen-1. *Cell Mol Life Sci* 61: 1826–1833, 2004.
- 39.-Sadowskia T, Dietricha S, Koschinskya F, Ludwiga A, Prokschb E, Titza B and Sedlaceka R. Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration. *Cell Mol Life Sci* 62: 870–880, 2005.
- 40.-Beck IM, Muller M, Mentlein R, Sadowski T, Mueller MS, Paus R and Sedlacek R. Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Keratinocytes Is Repressed by Transcription Factors Tst-1 and Skn-1a: Implications for Keratinocyte Differentiation. *J Invest Dermatol* 127: 1107–1114, 2007.
- 41.-Yu G, Kovkarova-Naumovski E, Jara P, Parwani A, Kass D, Ruiz V, Lopez-Otín C, Rosas IO, Gibson KF, Cabrera S, Ramírez R, Yousem SA, Richards TJ, Chensny LJ, Selman M, Kaminski N, Pardo A. MMP19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. *AJRCCM* Articles in Press, 2012.
- 42.-Gronemeyer H, Gustafsson JA and Laudet V. Principles for Modulation of the Nuclear Receptor Superfamily. *Nature* 3: 950-964, 2004.
- 43.-Kurakula K, Hamers AJ, Waard V, Vries CJ. Nuclear Receptors in atherosclerosis: A superfamily with many 'Goodfellas'. *Mol and Cell Endo* Articles in Press, 2012.
- 44.-Zassadowski F, Rochette-Egly C, Chomienne C, Cassinat B. Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cell Signal* Articles in Press, 2012.

- 45.-Jeong Y, Xie Y, Xiao G, Behrens C, Girard L, Wistuba II, Minna JD, Mangelsdorf DJ. Nuclear Receptor Expression Defines a Set of Prognostic Biomarkers for Lung Cancer. ***PLoS Med*** 7: 1-13, (2010).
- 46.-Jeong Y, Xie Y, Lee W, Bookout AL, Girard L, Raso G, Behrens C, Wistuba II, Gadzar AF, Minna JD, and Mangelsdorf DJ. Research Resource: Diagnostic and Therapeutic Potential of Nuclear Receptor Expression in Lung Cancer. ***Mol Endo*** 26: 1443–1454, 2012.
- 47.-Evans R. The Nuclear Receptor Superfamily: A Rosetta Stone for Physiology. ***Mol Endo*** 19(6): 1429–1438, 2005.
- 48.-Kurakula K, Hamers AJ, Waard V, Vries C. Nuclear Receptors in atherosclerosis: A superfamily with many ‘Goodfellas’. ***Mol and Cell Endo***, articles in press, 2012.
- 49.-Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burriss TP, and Rastinejad F. Structure of the Intact PPAR- $\gamma$ -RXR- $\alpha$  Nuclear Receptor Complex on DNA. ***Nature*** 456: 350–356, 2008.
- 50.-Bridgham JT, Eick GN, Larroux C, Deshpande K, Harms MJ, Gauthier ME, Ortlund EA, Degnan BM, Thornton JW. Protein Evolution by Molecular Tinkering: Diversification of the Nuclear Receptor Superfamily from a Ligand-Dependent Ancestor. ***PLoS Biol*** 8.1-13, 2010.
- 51.-Robbins GT and Nie D. PPARgamma, Bioactive Lipids, and Cancer Progression. ***Front Biosci***. 2012.
- 52.-Kulkarni AA, Thatcher TH, Olsen KC, Maggirwar SB, Phipps RP and Sime PJ PPAR- $\gamma$  Ligands Repress TGF $\beta$ -induced Myofibroblast Differentiation by Targeting the PI3K/Akt Pathway: Implications for Therapy of Fibrosis. ***PLoS ONE*** 6. 2011.
- 53.-Ferguson HE, Kulkarni A, Lehmann GM, Garcia-Bates TM, Thatcher TH, Huxlin KR, Phipps RP and Sime PJ. Electrophilic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Ligands

Have Potent Antifibrotic Effects in Human Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41:722–730, 2009.

54.-Burgess HA, Daugherty LE, Thatcher TH, Lakatos HF, Ray DM, Redonnet M, Phipps RP and Sime PJ. PPAR $\gamma$  agonists inhibit TGF- $\beta$  induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L1146–L1153,2005.

55.-Lin Q, Fang LP, Zhou WW, and Liu XM, Rosiglitazone inhibits migration, proliferation, and phenotypic differentiation in cultured human lung fibroblasts. *Exp Lung Res* 36. 120-128, 2010.

56.-Milam JE, Keshamouni VG, Phan SH et al. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am Jour of Phys* 294. L891–L901, 2008.

57.-Tan X, Dagher H, Hutton CA and Bourke JE. Effects of PPAR $\gamma$  ligands on TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Respir Res* 11. 2010.

58.-Milam JE, Keshamouni VG, and Phan SH. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am Jour of Phys* 294, pp. L891–L901, 2008.

59.-Wright HM, Clish CB, Mikami T. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  inhibits adipocyte differentiation. *Jourl of Biol Chem* 275. 1873–1877, 2000.}

60.-Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R. Effect of rosiglitazone and 15-deoxy- $\delta$ 12, 14-prostaglandin J2 on bleomycin-induced lung injury. *Euro Resp* 25. 225–234, 2005.

61.-Cabrera S. Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 53-61, 2006.

62. Li YQ, Wang SJ, Wang CX, Gao DF, Ding KN, Niu XL. Effect of peroxisoma proliferator activated receptor- $\gamma$  agonist on angiotensin converting enzyme 2 mRNA expression in monocyte-derived macrophages of essential hypertensive patients. *Chine Acad Med Sci.* 34. 379-383, 2012.