

T
931

7997'

**“EVALUACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS
EN EL EFECTO ANTIFIBROSANTE DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
DE FIBROBLASTOS (FGF-1) SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLAGENASA
(MMP-1) Y COLÁGENA EN FIBROBLASTOS DE PULMÓN”**

COMUNICACIÓN IDONEA DE RESULTADOS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACEÚTICAS

PRESENTA

Q.F.B DORIAN IVÁN ALEMAN NAVA
206280252

COMITE TUTORAL

TUTOR: DRA. JULIA PEREZ RAMOS
ASESOR: DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA
ASESOR: DR. CARLOS RAMOS ABRAHAM

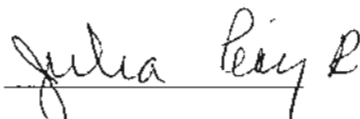
ABRIL 2009

"EVALUACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO ANTIFIBROSANTE DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGF-1) SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLAGENASA (MMP-1)
Y COLÁGENA EN FIBROBLASTOS DE PULMÓN"

Vo. Bo.

COMITÉ TUTORAL

Tutor:

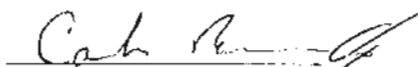


Dr. Julia Pérez Ramos

Asesores:



Dr. José Guadalupe Cisneros Lira



Dr. Carlos Ramos Abraham

Alumno:



Q.F.B. Dorian Iván Alemán Nava

Matricula: 206280252

"EVALUACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO ANTIFIBROSANTE DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGF-1) SOBRE LA EXPRESIÓN DE COLAGENASA (MMP-1)
Y COLÁGENA EN FIBROBLASTOS DE PULMÓN"

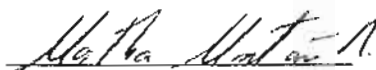
JURADO DEL EXÁMEN DE GRADO

Presidente:



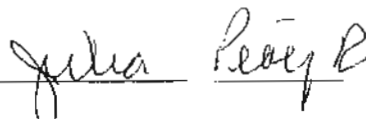
Dr. Víctor Manuel Ruiz Lopez

Vocal:



M. en C. Martha Montaña Ramirez

Secretaria:



Dra. Julia Perez Ramos

RESUMEN

En la presente investigación se analizó la cascada de señalización de las proteínas MAPK implicadas en el aumento de MMP-1 en fibroblastos normales de pulmón, estimulados con FGF-1 más heparina, además de estudiar su efecto en la expresión de genes de MMP-1, colágena y el inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1, del inglés: tissular inhibitors of metalloproteinases-1). Para ello, diferentes cultivos de fibroblastos de pulmón, fueron estimuladas con el FGF-1 más heparina y adicionalmente con inhibidores de las diferentes vías de las MAPK (ERK 1/2, p38, JNK/STAT), posteriormente a los fibroblastos, se les extrajo el RNA total o proteínas, para su estudio por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o por medio de la técnica Western-blot respectivamente.

Para el análisis de las muestras por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, se construyeron curvas de cada uno de los genes estudiados (MMP-1, colágena, TIMP-1). Para el análisis de proteínas por medio de la técnica de Western-blot, se utilizaron anticuerpos específicos contra colágena, proteínas fosforiladas y proteínas totales de la vía ERK.

Los resultados obtenidos señalan, que la estimulación de fibroblastos normales de pulmón con FGF-1 más heparina, aumentan la expresión de MMP-1, colágena y TIMP-1, y que las vías utilizadas para ello son la ERK y la JNK/STAT de las MAPK. Sin embargo, el aumento en la expresión de colágena y de TIMP-1, es ampliamente superado por la expresión de MMP-1; con ello se demuestran las propiedades antifibrosantes del FGF-1 más heparina en fibroblastos normales de pulmón.

Agradecimiento al CONACYT

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca con número de referencia 203139, para realizar mis estudios de maestría y continuar con mi formación académica.

Agradecimientos Personales

A mi familia, mi padre Jesús Alemán Díaz y María Luisa Reyna Nava dedico este esfuerzo, gracias por su comprensión, motivación e infinito apoyo que me han brindado para lograr todas y cada una de mis metas así como su confianza para lograr mis sueños y anhelos.

A mi hermano Gibran Sidney, porque así como mis padres siempre ha estado junto a mí apoyándome.

A la Doctora Julia Pérez Ramos y la Maestra Cristina Fresán Orozco por haberme ofrecido toda su dedicación, comprensión, apoyo y sobre todo su cariño, sin cuyo esfuerzo no hubiera logrado uno de mis mayores logros.

A mis asesores el Doctor José Guadalupe Cisneros Lira, el Doctor Carlos Ramos Abraham y el Doctor Victor Ruiz por todas sus enseñanzas, su tiempo y espacio.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias que me abrió sus puertas para la realización de este proyecto.

A mi *Alma Máter*, mi Universidad Autónoma Metropolitana y segundo hogar, que me abrió los ojos al increíble mundo de la ciencia y me ofreció una mejor comprensión de mi mundo.

Abreviaciones

CXCL	Ligandos con dominios CXC
ERK	Proteínas cinasas activadas por señales extracelulares
EPID	Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas
FGF-1	Factor de crecimiento de fibroblastos-1
FGFR	Receptor de factor de crecimiento de fibroblastos
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
GAG	Glicosaminoglicano
HPX	Dominio hemopexina
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
JNK	Proteínas cinasas c-Jun amino terminal
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MKs	Proteínas cinasas activadas por MAP cinasas
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular
MMP-1	Colagenasa intersticial
MMP-2	Gelatinasa A
NIU	Neumonía Intersticial Usual
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TGF- β	Factor de crecimiento transformante-beta
TIMP	Inhibidor de Metaloproteinasas de tejido
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral-alfa

ÍNDICE

	Página
<i>Resumen</i>	4
<i>Introducción</i>	9
<i>Marco Teórico</i>	
Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas.....	10
Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	10
Tratamiento contra la fibrosis pulmonar idiopática.....	12
Nuevas estrategias terapéuticas.....	14
Matriz Extracelular.....	15
Metaloproteinasas.....	18
Fibroblastos.....	22
Factores de crecimiento de fibroblastos.....	22
Receptores de los FGFs.....	23
Cascada de señalización de las de proteínas cinasas activadas por mitógenos..	27
<i>Planteamiento del problema</i>	30
<i>Objetivos</i>	31
<i>Metodología</i>	
Cultivos celulares.....	32
Tratamiento con FGF-1/heparina.....	32
Obtención y purificación de RNA total.....	33
Síntesis de ADN complementario.....	33
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	33
Obtención de proteínas/cuantificación.....	34
Western blot.....	35
<i>Resultados</i>	
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	36
Análisis de proteínas por Western blot.....	44
<i>Discusión de resultados</i>	46
<i>Conclusiones</i>	48
<i>Bibliografía</i>	50

INTRODUCCIÓN

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un grupo de padecimientos respiratorios que tiene como resultado un depósito excesivo de moléculas de la matriz extracelular. Una característica fundamental de esta enfermedad es la presencia de focos de fibroblastos/miofibroblastos ampliamente dispersos por todo el parénquima pulmonar (Selman, 2005).

Los fibroblastos representan el tipo celular más abundante en los tejidos conectivos no cartilagosos y participan de manera crucial en su fisiopatología. Estas células participan en la remodelación de la matriz extracelular mediante la producción de diversas enzimas de la familia de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs, del inglés: matrix metalloproteinases), tales como la gelatinasa A (MMP-2), estromelisin y la colagenasa intersticial (MMP-1); diferentes estudios muestran que esta última es una enzima que se encuentra sobre-expresada en patologías como el cáncer, la artritis reumatoide, el enfisema pulmonar y la fibrosis pulmonar (Kuhn, 1991).

Se ha demostrado que la activación de las enzimas pertenecientes a la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, del inglés mitogen-activate protein kinases) desempeñan un papel muy importante en la regulación de la expresión de la MMP-1. Los factores de crecimiento de fibroblastos, son pequeños polipéptidos, que tienen en común ciertas características estructurales y se unen a receptores específicos de actividad cinasa de tirosina con ayuda de moléculas semejantes a heparina, induciendo así la dimerización del receptor y su activación para finalmente desencadenar una serie de señales en cascada (Powers, 2000).

Existen estudios que sugieren que el factor de crecimiento de fibroblastos-1 (FGF-1), puede desempeñar un papel protector para la fibrosis, debido a que ejerce un efecto antifibrosante sobre fibroblastos derivados de pulmón ya que disminuye la síntesis de colágena e incrementa la expresión de la colagenasa intersticial (Becemil, 1999). Sin embargo, la vía de señalización utilizada por el FGF-1, y gracias al cual podrían realizarse una mayor cantidad de estudios en contra de la fibrosis pulmonar, no ha sido dilucidada.

FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA

Enfermedades pulmonares intersticiales difusas

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo heterogéneo de padecimientos, que presentan manifestaciones clínicas, radiológicas y funcionales respiratorias comunes, que afectan a las estructuras alveolo-intersticiales del pulmón y a menudo, a las pequeñas vías aéreas y la vasculatura pulmonar (Ancochea, 2004). Estas enfermedades tienen como resultado final el depósito excesivo de moléculas de matriz extracelular que abarca de manera difusa al intersticio pulmonar, espacios intraalveolares (intraluminales) y en algunos casos, compromete inclusive las vías aéreas periféricas. En varias de estas patologías se han identificado los agentes etiológicos, que pueden ser físicos, químicos y biológicos; sin embargo, cuando es de causa desconocida se denomina como fibrosis pulmonar idiopática (FPI) o neumonía intersticial usual (NIU) (Selman, 1996).

Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

La EPID más agresiva es la denominada fibrosis pulmonar idiopática. Esta enfermedad es progresiva, irreversible, incapacitante y letal, esto debido a que atrofia la capacidad del pulmón para realizar el intercambio gaseoso correctamente. La FPI se caracteriza por una marcada presencia de focos de fibroblastos/miofibroblastos ampliamente dispersos por todo el parénquima pulmonar y un incremento en la respuesta a citocinas fibrogénicas. En esta patología, los fibroblastos y miofibroblastos producen cantidades exageradas de moléculas de la matriz extracelular, especialmente fibras de colágenas (Montero, 2006; Ramos, 2001).

Durante el desarrollo de la fibrosis pulmonar se ha demostrado un incremento en la producción de procolagenasa, la activación de la misma, el incremento en la expresión de inhibidores tisulares de metaloproteinasas y la susceptibilidad de la colágena a la degradación por parte de la enzima en el pulmón (Pardo, 1992).

Tradicionalmente se ha considerado que en la FPI ocurren cuatro eventos: un daño o agresión inicial en el epitelio alveolar vascular, una respuesta inflamatoria que afecta el intersticio y a los espacios alveolares, una fase caracterizada por la proliferación de fibroblastos y finalmente una remodelación anormal con depósito exagerado de moléculas de matriz extracelular, en especial de colágenas tipo I y III (figura 1) (Selman, 1996; Sheppard, 1992). Sin embargo recientes estudios difieren de la propuesta tradicional en donde la FPI es precedida por la inflamación y recientemente se ha sugerido que la FPI es una patología no inflamatoria que resulta de un proceso que involucra daño en los epitelios alveolares y la remodelación anormal del tejido alrededor de los sitios de lesión, en donde se forman los focos de fibroblastos/miofibroblastos (Montero, 2006).

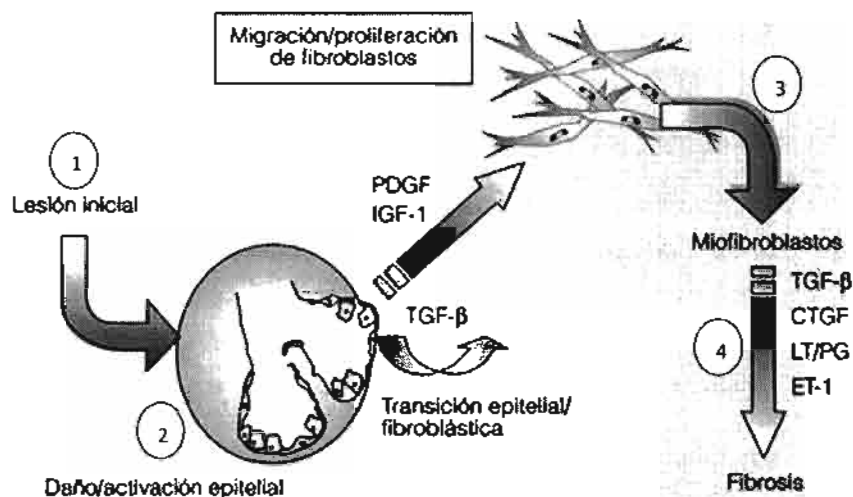


Figura 1. Secuencia para el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática: 1. Lesión inicial al entorno alveolar, 2. Liberación de citocinas inflamatorias, 3. Proliferación excesiva de fibroblastos, 4. Remodelación anormal de la estructura pulmonar debido al desequilibrio de moléculas de la matriz extracelular. "Imagen extraída de: Selman M. Navarro C. y Gaxiola M. (2005) Fibrosis pulmonar Idiopática: en busca de un tratamiento eficaz. *Arch Bronconeumol*, 41 (Supl5): 15"

Debido a ello, se han postulado al menos 2 diferentes vías para el desarrollo de la fibrosis pulmonar, la vía inflamatoria, que participa en las enfermedades pulmonares intersticiales difusas asociadas al uso de diferentes medicamentos, exposición a agentes ocupacionales y/o ambientales y enfermedades autoinmunes entre otras; y por

otra parte la vía epitelial-fibroblástica que participa en la patogénesis de la FPI. Sin embargo la hipótesis más aceptada, sostiene que la fibrosis es precedida y provocada por un proceso inflamatorio crónico que daña el tejido pulmonar, el daño a los epitelios provoca la liberación de moléculas quimioatrayentes y moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de células inflamatorias, incluyendo macrófagos, neutrófilos, linfocitos y eosinófilos (Selman, 2001). Los focos de fibroblastos, distribuidos ampliamente en el parénquima pulmonar, se comportan como pequeñas áreas de lesiones pulmonares agudas, que proliferan y en un intento de reparar el daño alveolar producen grandes cantidades de colágeno, contribuyendo así a la acumulación de moléculas de la matriz extracelular que dañan los alveolos (Gauldie, 1992). Así mismo, la remodelación anormal que se observa en la matriz extracelular de los pulmones de pacientes con FPI es, al menos en parte, debido a un desequilibrio entre algunas MMPs como la colagenasa intersticial (MMP-1) o las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, y sus inhibidores (Kuhn, 1991).

En el desarrollo de la fibrosis pulmonar están implicadas diversas citocinas como la IL-8, el PDGF (del inglés: platelet derived growth factor) y algunas quimiocinas (subfamilia de citocinas caracterizadas por tener una región conservada de 4 cisteínas en grupos de dos de alta actividad quimiotáctica, ligadas principalmente a procesos inflamatorios) entre las que destacan la CCL17, CCL22, CCL2, y CCL3 (tabla 1) (Gauldie, 1993). La proliferación de fibroblastos y la producción de moléculas de la matriz extracelular es iniciada y sostenida por una cascada de citocinas inducidas por el TNF- α (del inglés: tumor necrosis factor- α) y que incluye a las interleucinas (IL-1 α , IL-1 β) y TGF- β , (del inglés: tumor growth factor- β) (Agostini, 2006; Senties, 2005).

Tratamiento contra la Fibrosis pulmonar Idiopática

Debido a que la hipótesis más aceptada sostiene que la FPI es precedida por un proceso inflamatorio, el tratamiento tradicional de esta enfermedad implica elevadas dosis de corticosteroides por un tiempo prolongado, ya sean solos o en combinación con medicamentos inmunosupresores o citotóxicos como la azatioprina y ciclofosfamida. Por desgracia ninguno de esos fármacos ha demostrado ser realmente útil a la hora de mejorar el pronóstico de la mayoría de los pacientes (Raghu, 1991).

TABLA 1. CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA PATOGENESIS DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA

<i>Citocina/Quimiocina</i>	<i>Fuente</i>	<i>Efecto</i>
IL-1	Macrófagos	Inflamación, Proliferación fibroblástica, secreción de PDGF
TNF- α	Macrófagos Linfocitos Células Epiteliales	Proliferación fibroblástica, secreción de citocinas profibróticas y proinflamatorias (TGF- β , IL-1, IL-6, PDGF)
TGF- β	Macrófagos Células Epiteliales Células Endoteliales	Reclutamiento y activación de fibroblastos y monocitos, diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, estimulación de angiogénesis
PDGF	Macrófagos Fibroblastos Células Endoteliales Células Epiteliales	Proliferación fibroblástica
CCL2, CCL3	Macrófagos Linfocitos Fibroblastos	Reclutamiento de monocitos Secreción de citocinas profibróticas
CCL17	Macrófagos Células Epiteliales Células Dendríticas	Reclutamiento de linfocitos y monocitos
CXCL9, CXCL10	Macrófagos Fibroblastos Células Endoteliales	Inhibición de angiogénesis secreción de IFN- γ

Abreviaciones: Ligando con dominio CC, CXCL: Ligandos con dominio CXC, PDGF: Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas, IFN- γ : Interferón Gamma, IL: Interleuquina, TGF- β : Factor Beta de Transformación del crecimiento, TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa. "Texto extraído de: Agostini C.y Gurrieri C. (2006) Chemokine/Cytokine Cocktail in Idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 3: 359"

La mayor parte de los estudios que han valorado la eficacia de los fármacos utilizados en contra de la FPI son controvertidos, y han incluido, con toda probabilidad a pacientes con otros tipos de neumonías intersticiales menos radicales. De las estrategias terapéuticas actuales, la única que ha demostrado ser útil para mejorar ligeramente el pronóstico, es la asociación de prednisona y azatioprina (Raghu, 1991).

Nuevas Estrategias Terapéuticas

Los ensayos clínicos actuales se basan en medicamentos dirigidos contra mediadores biológicos que actúan sobre el epitelio y los fibroblastos, como el TGF- β 1 y sustancias inhibitoras de la síntesis de colágena. En este contexto, existen determinadas líneas de trabajo que se proponen como posibles tratamientos en contra de la FPI, como lo son el interferón gamma, fármacos anti receptor de TNF- α , N-acetilcisteína, entre otros (Selman, 2001).

- *Interferón gamma (IFN- γ)*. El IFN- γ es una citocina endógena que tiene efectos antifibróticos, antiinfecciosos, antiproliferativos e inmunomoduladores. En la FPI existe un desequilibrio entre las citocinas producidas por los linfocitos colaboradores 2 (Th2) y las producidas por los linfocitos colaboradores 1 (Th1) a favor de las primeras. El IFN- γ altera este cociente a favor de los linfocitos Th1. En estudios *in vitro* y con modelos animales se ha demostrado que el IFN- γ inhibe la proliferación de los fibroblastos, el depósito de matriz extracelular y la síntesis de colágena que se debe en parte a su capacidad para bloquear el TGF- β (Montero, 2006).

- *Fármacos anti receptor de TNF- α* . El TNF- α es una citocina multifuncional que parece tener algunas actividades profibróticas. Estudios experimentales, demuestran que la administración del receptor del TNF soluble recombinante atenúa la fibrosis inducida por bleomicina, además de que ratones deficientes del TNF- α prácticamente no desarrollan fibrosis por sílice (Selman, 2005).

- *N-acetilcisteína (NAC)*. Existen evidencias que constatan la presencia de un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes como parte de la patogenia de la fibrosis

pulmonar idiopática. En efecto, la fibrosis pulmonar idiopática se caracteriza por un estrés oxidativo excesivo en el tracto respiratorio inferior. Las concentraciones de glutatión (el mayor componente del sistema de defensa antioxidante del pulmón humano, que en condiciones normales, protege al tracto respiratorio inferior del estrés oxidativo) se encuentran reducidas de forma importante en la superficie epitelial alveolar de los pacientes con FPI (Ancochea, 2004).

- *Pirfenidona*. El efecto antifibrótico de la pirfenidona ha quedado demostrado en diversos estudios tanto *in vitro* como en modelos animales. *In vitro* la pirfenidona, inhibe la síntesis de colágena estimulada por el TGF- β , disminuye la formación de matriz extracelular y reduce la producción de citocinas fibrogénicas como el TNF- α , el TGF- β y el factor de crecimiento derivado de plaquetas. En animales con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se ha visto que la pirfenidona disminuye el desarrollo de esta (Ancochea, 2004).

- *Factor de crecimiento de fibroblastos ácido-1*. Existen resultados que demuestran que el FGF-1 en combinación con heparina incrementa la expresión del mRNA de la MMP-1, y disminuye la síntesis de colágena en fibroblastos de pulmón, acompañado de una disminución en la expresión de su mRNA (Becerra, 1999; Prudovsky, 2008). Esto sugiere que el FGF-1 puede desempeñar un papel protector para la fibrosis debido a que ejerce un efecto antifibrosante sobre fibroblastos derivados de pulmón. Adicionalmente, el FGF-1 y su receptor se sobre-expresan en la fibrosis pulmonar, particularmente en sitios donde no hay lesión (Barrós, 1997).

Matriz Extracelular

La matriz extracelular está formada por un conjunto de macromoléculas, que se localizan entre células de un determinado tejido o en el lado externo de la membrana plasmática de las células. Estos componentes son en general producidos por las mismas células o son aportados por la corriente sanguínea. En ambos casos forman el medio donde las células sobreviven, se multiplican y desempeñan sus funciones. Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular son de cuatro tipos: (1) sistema

elástico, (2) proteoglicanos, (3) glicoproteínas multifuncionales (laminina, fibronectina, tenascina, trombospondina entre otras) y (4) sistema de colágenas (Susuki, 2004).

1. *El sistema elástico* está formado por elastina, que es un polímero insoluble, constituido por moléculas solubles de tropoelastina, y por una glicoproteína denominada fibrilina. La tropoelastina está formada por cadenas de polipéptidos de aproximadamente 800 residuos de aminoácidos derivados de la lisina y denominados desmosina e isodesmosina. Durante el proceso de desarrollo de una fibra elástica, el componente fibrilar es el primero en formarse, seguido de depósitos de elastina, probablemente debido a una interacción iónica entre la elastina y la superficie microfibrilar, como consecuencia de sus cargas opuestas. La cadena de tropoelastina es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso, donde inicialmente se produce la formación de una secuencia con 20 residuos. De esta secuencia parece formarse dos tipos de tropoelastina, denominadas tropoelastina A, que posee un peso molecular de aproximadamente 70 KDa, y tropoelastina B, la cual tiene un peso estimado de 73 KDa (Solera, 2007).

2. *Los proteoglicanos* son complejos de macromoléculas formados por la asociación covalente entre cadenas polipeptídicas y glicosaminoglicanos. Estas últimas se forman de polímeros de unidades de disacáridos (hexosamina más ácido hexaúronico). El núcleo proteico de los diferentes proteoglicanos varía de peso molecular, de 19 a 500 KDa. La función de los proteoglicanos es contribuir a la adhesividad celular mediante su interacción con la superficie celular y con otros componentes matriciales. El sindecan, por ejemplo, proteoglicano de la membrana celular, transmite señales a proteínas transmembranales, como las integrinas, que a su vez interactúan con el citoesqueleto, el cual facilita la interacción de los filamentos de actina (Iozzo, 1998).

3. *Las glicoproteínas* son proteínas multifuncionales y las más importantes encontradas en la matriz extracelular son: fibronectina (FN), laminina (LN), tenascina (TN) y trombospondina (TB). Para cumplir con sus funciones estas moléculas necesitan de

otras moléculas que sirven de unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto celular, como son: las integrinas, las caderinas, las inmunoglobulinas y las selectinas (Arenas, 2004).

4. *El sistema de colágenas* resulta de la asociación de tres cadenas polipeptídicas con una formación característica de triple hélice. Además de la triple hélice, las colágenas poseen dominios globulares, que le confieren flexibilidad y especificidad a las moléculas que los poseen.

Actualmente se conocen aproximadamente 27 tipos de colágenas y han sido clasificadas dependiendo su tipo de agregación en colágenas fibrilares y colágenas no fibrilares.

La colágena tipo I es un heterotrímero formado por dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2(I)$ de aproximadamente 300 nm. La triple hélice es particularmente resistente a la degradación de la mayoría de las proteinasas con excepción de las colagenasas. Las colágenas son sintetizadas por fibroblastos, osteoblastos y odontoblastos en donde residuos específicos de prolina y lisina son hidroxilados para formar hidroxiprolina e hidroxilisina respectivamente que junto con otras cadenas forman puentes de hidrógeno para generar la estructura de triple hélice de pro-colágena (Kadler, 1997). Las pro-colágenas son secretadas por los fibroblastos a través del aparato de Golgi donde los propéptidos N-terminal y C-terminal son cortados por proteasas específicas. Las moléculas de colágena maduras se agregan para formar fibras de colágena mayores y ayudar a formar la matriz extracelular junto con otras moléculas, se encuentra principalmente en la dermis, tendones, en la lámina propia de las mucosas y en la placenta se localiza a nivel del estroma veloso (Ghosh, 2002). La colágena tipo-1 es la molécula más abundante y participa en los procesos de inflamación crónica y fibrosis, sustituyendo los tejidos parenquimatosos (Woessner, 2001).

El catabolismo de la colágena se realiza por un conjunto de enzimas proteolíticas del grupo de las metaloproteinasas, las cuales son producidas por los fibroblastos y otros tipos celulares y liberadas al medio extracelular, donde actúan sobre las fibras de

colágena y producen su degradación. Estas enzimas se denominan en conjunto metaloproteinasas de matriz extracelular. Hasta el momento se han identificado y clasificado cerca de veinte (Woessner, 2001).

Metaloproteinasas de matriz extracelular

Las MMPs son importantes para el desarrollo del ambiente celular requerido durante el desarrollo y la morfogénesis. La remodelación de la matriz extracelular interviene en el inicio y la progresión de una gran variedad de condiciones fisiológicas normales, como el desarrollo embrionario y la reparación de tejidos, esta remodelación es llevada a cabo principalmente gracias al equilibrio de moléculas como gelatinas, colágenas y otras (Enman, 2007).

Las MMPs o también llamadas colectivamente matrixinas, son una familia de más de 20 endopeptidasas extracelulares que contiene Zn^{2+} en su sitio activo y requieren de Ca^{2+} para su catálisis (Jinnin, 2005). Estas metaloenzimas degradan a los diversos componentes de la matriz extracelular tanto en su forma nativa como desnaturalizada, además de otras moléculas incluyendo factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, citocinas, factores de coagulación y moléculas de adhesión celular (Willenbrock, 1994).

Las MMPs se dividen en familias dependiendo de la especificidad hacia su sustrato, similitud en la secuencia de sus aminoácidos y la organización de sus dominios. Las MMPs de los vertebrados, se dividen principalmente en cinco grupos (tabla 2)(Nagase, 1999).

La estructura básica de las MMPs presenta una serie de dominios característicos: un péptido señal que dirige la secreción al exterior de la célula, un propéptido que mantiene a la enzima inactiva hasta que sufre un corte proteolítico y un dominio catalítico carboxílico terminal que une zinc (Atkinson, 2000). Sobre esta estructura básica, aparecen diversas variantes, como un dominio de tipo hemopexina que regula la especificidad del sustrato y las interacciones con los inhibidores endógenos, o un

dominio transmembranal en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática (figura 2) (Visse, 2003; Hemmann, 2007).

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS

Enzima	MMP	Sustrato
1. Colagenasas		
Colagenasa 1	MMP-1	Colágena I, II, III, VII, VIII y X, proteoglicanos, MMP-2, MMP-9
Colagenasa 2	MMP-8	Colágena I, II, III, V, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos
Colagenasa 3	MMP-13	Colágena I, II, III y IV, gelatina, proteoglicanos, PAI-2
Gelatinasa -A	MMP-2	Gelatina, colágena I, IV, V, VII, X, XI y XIV, elastina
Gelatinasa -B	MMP-9	Gelatina, colágena IV, V, VII y X, elastina
2. Estromelisinias		
Estromelisinina 1	MMP-3	Colágena III, IV, IX, X gelatina, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9
Estromelisinina 2	MMP-10	Colágena III, IV y V, gelatina, caseína, MMP-1, MMP-8
Estromelisinina 3	MMP-11	desconocido
3. MMP's de Membrana		
MT-MMP-1	MMP-14	Colágena I, II, III, gelatina, MMP-2 y MMP-13
MT-MMP-2	MMP-15	MMP-2, gelatina
MT-MMP-3	MMP-16	MMP-2
MT-MMP-5	MMP-24	
4. Matrilisinias		
Matrilisinina 1	MMP-7	Colágena IV y X, gelatina, fibronectina, laminina
Matrilisinina 2	MMP-26	Colágena IV, fibronectina, fibrinógeno, gelatina
5. Otras		
Enamelisinina	MMP-20	Amelogenina
XMMP	MMP-21	Desconocido
CMMP	MMP-27	Desconocido
Epilisinina	MMP-28	Caseína

"Texto extraído de: Visse R. y Nagase H. (2008) Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res.* 92: 829"

La MMP-1 denominada también colagenasa-1 o colagenasa intersticial, es expresada en su forma latente o zimógeno con un peso aproximado de 52 KDa, generalmente está relacionada con el desarrollo fisiológico, la morfogénesis tisular y la cicatrización de heridas. Además de los fibroblastos, muchas otras células como queratinocitos, células endoteliales y macrófagos producen la MMP-1 (Cuadros, 2004).

La MMP-1 es encargada de degradar la colágena tipo I, II y III como parte del remodelamiento de la matriz extracelular, aunque también es responsable de la degradación de otras moléculas que no pertenecen a la matriz extracelular y moléculas de superficie celular (Matsumura, 2004). Adicionalmente, la función de las MMPs depende de la interacción con sus inhibidores endógenos, los TIMP. Los TIMPs son las principales moléculas que regulan la actividad de las MMPs en el microambiente tisular y hasta la fecha se han caracterizado 4 miembros (TIMP 1-4) (Gomez, 1997).

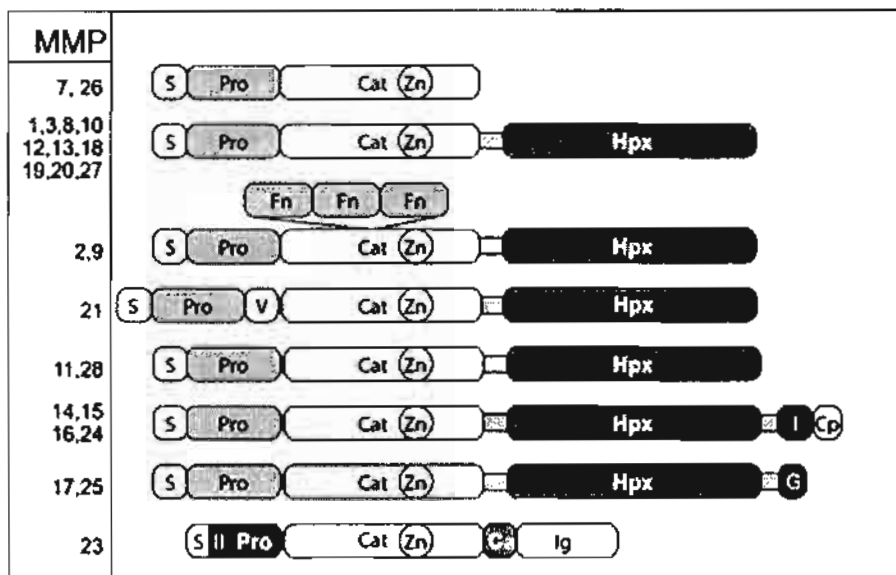


Figura 2. Estructura de las diferentes familias de metaloproteinasas. El nombre de los diferentes dominios se indica a continuación: S, péptido; Pro, propéptido; Cat, dominio catalítico; Zn, sitio activo de zinc; Hpx, hemopeptina; Fn, dominio fibronectina; V, inserto vitronectina; I, dominio transmembranal tipo I; II, dominio transmembranal tipo II; G, glicosilfosfatidilinositol; Cp, dominio citoplasmático; Ca, región de cisteína; Ig, dominio semejante a inmunoglobulina G

Estas proteínas tienen características similares en su estructura, pero cada una muestra rasgos distintivos en sus propiedades bioquímicas y patrones de expresión. Sus moléculas tienen un peso de entre 21-29 KDa y su estructura es similar entre el 37 y el 51%. Una característica importante de los TIMPs es la presencia de 12 residuos de Cys altamente conservados que se unen y forman seis puentes de disulfuro intracadena que determinan una estructura con dos dominios: el dominio amino-terminal y el dominio carboxilo-terminal. Los TIMPs son secretados por una gran variedad de células, incluyendo fibroblastos, macrófagos y células epiteliales (Baker, 2002).

El TIMP-1 es una glicoproteína de un peso aproximado de 28.5 KDa que cuenta con un gran número de puentes de disulfuro que hace a la molécula resistente bajo condiciones extremas de temperatura y pH. Cada molécula de TIMP se une en una relación 1:1 de forma no covalente con moléculas activas de MMPs, inhibiendo de esta forma la actividad proteolítica de estas enzimas, además TIMP-1 puede formar complejos con moléculas pro-MMP-9. La importancia del dominio N-terminal en su actividad es demostrada por el hecho de que mutaciones puntuales en esta región de la proteína inhabilitan su capacidad de inhibir MMPs. Existen múltiples sitios dentro dominio N-terminal que resultan fundamentales para su interacción con las MMPs, como por ejemplo se ha demostrado que son cruciales los residuos adyacentes al puente de disulfuro Cys-1-Cys-70 para la actividad inhibitoria de TIMP-1 (Wurtz, 2005).

El desequilibrio entre las metaloproteinasas y sus inhibidores tiene implicaciones en la remodelación de la matriz extracelular y en diversos fenómenos asociados como la apoptosis epitelial y la migración celular, como es el caso de los fibroblastos en la fibrosis pulmonar idiopática en donde se encuentra sobreexpresada (Xaubet, 2007).

Fibroblastos

Los fibroblastos son células que representan el tipo celular más abundante en los tejidos conectivos no cartilaginosos, sin embargo hay diferencias en términos de estructura, fisiología, comportamiento, función y antígenos de superficie (Dyatiev, 2003). Los fibroblastos son de forma fusiforme o de huso, con un diámetro aproximado de 26µm, presentan actinas α , β y γ en su citoesqueleto, y un patrón de organelos típico de una célula secretora, es decir retículo endoplasmico y un aparato de Golgi desarrollado (Ramos, 2004).

Entre las funciones que desarrollan los fibroblastos, se encuentra el remodelamiento de la matriz extracelular, mediante la producción de diversas moléculas incluyendo a la MMP-1, MMP-2 proteoglicanasas, glicosaminoglicanasas, TIMPs y los factores de crecimiento. Por otra parte, interactúan con diversas células locales e inflamatorias, a través de diferentes tipos de mensajes químicos como las quimiocinas, neuropéptidos y diversos factores de crecimiento (Akamine, 1992).

Factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)

Los factores de crecimiento de los fibroblastos son pequeños polipéptidos que comparten entre sí, características estructurales y la mayoría de ellos tienen alta afinidad por su unión a heparina. Muchos FGFs contienen péptidos señal para su secreción en un ambiente extracelular, donde pueden unirse a sulfato de heparina, heparina, o glicosaminoglicanos de la matriz extracelular. Los FGFs se unen a receptores específicos conocidos como receptores de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFR, del inglés: fibroblast growth factor receptors) a través de glicosaminoglicanos, logrando así la dimerización y la activación de los receptores, para finalmente desencadenar una serie de transducción de señales dentro de la célula. Algunos FGFs, son potentes factores angiogénicos y muchos de ellos juegan papeles importantes en el desarrollo embrionario y la cicatrización. La señalización provocada por los FGFs al parecer, también juega un papel importante en el desarrollo de tumores y la angiogénesis, mientras que la señalización autocrina de los mismos puede ser de

particular importancia en la progresión de cánceres dependientes de hormonas esteroideas (Powers, 2000).

A la fecha, se han descubierto más de 20 FGFs diferentes, que son nombrados consecutivamente. Los FGFs inducen principalmente actividad mitogénica, quimiotáctica y angiogénica en las células sobre las que actúan, pero también pueden inducir diferenciación y síntesis de proteínas. El FGF-1 es el primer miembro de esta familia y es el prototipo de estos factores. El FGF-1 ha sido ampliamente caracterizado a nivel biológico y molecular. Este factor consta de una simple cadena de polipéptidos formada con 155 aminoácidos con un peso molecular aproximada de 17 KDa, codificados por una sola copia del gen localizado en el cromosoma 3. El FGF-1, es un potente factor angiogénico, inductor de proliferación, diferenciación, y otras actividades celulares en células endoteliales, mesenquimales, fibroblastos entre otras. Debido a que el FGF-1 está presente en la matriz extracelular en asociación con los glicosaminoglicanos se ha sugerido que puede actuar como regulador local para el crecimiento y diferenciación celular durante procesos fisiológicos tales como la embriogénesis, angiogénesis y durante la reparación tisular (Becerril, 1999).

Receptores de los factores de crecimiento de fibroblastos (RFGFs)

Existen 4 diferentes receptores asociados a los FGFs denominados numéricamente desde FGFR-1 hasta FGFR-4, con una similitud del 55% al 72% en la composición de sus aminoácidos, teniendo en común que para la activación de los dominios de actividad cinasa de tirosina que lo conforman, es necesaria una dimerización. Los FGFRs son proteínas transmembranales, que contienen 3 dominios extracelulares similares a Ig (designados IgI, IgII, IgIII), una región ácida entre IgI e IgIII, un dominio transmembranal y una región intracelular con dominios cinasa de tirosina (figura 3) (Klint, 1999).

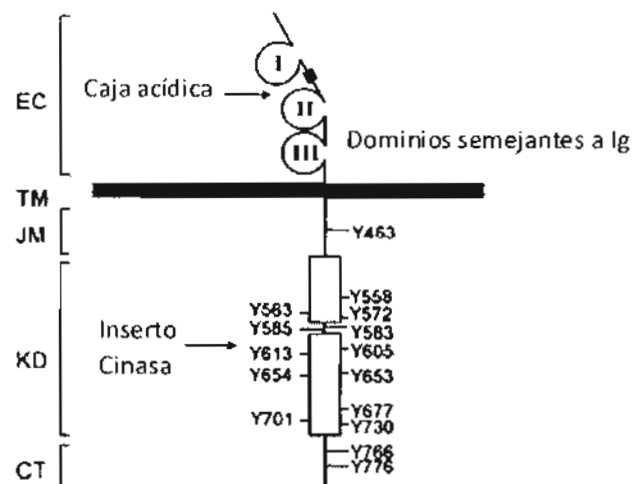


Figura 3. Estructura del FGFR-1. La estructura es similar para los otros 4 receptores. El dominio extracelular (EC) puede estar formado por dos dominios (Ig II, Ig III), o tres (Ig I, Ig II, Ig III) dominios similares a inmunoglobulina Ig, seguido de una parte transmembranal (TM), un dominio yuxtamembranal (JM), un dominio cinasa (KD) dividido por un pequeño inserto cinasa, y un una parte C-terminal (CT). Los números marcados indican los residuos de tirosina.

Se ha demostrado que los dominios IgII e IgIII, juegan un papel importante para la unión de los FGFs y posterior dimerización de los receptores con una estructura final de dos receptores unidos por una molécula de FGF que interacciona con los dominios Ig (figura 4). Sin embargo, las interacciones entre FGF y el FGFR no son suficientes para estabilizar los dímeros de FGFR en la superficie celular bajo condiciones fisiológicamente normales. La heparina o el sulfato de heparina es esencial para la estabilización de dichos complejos, ya que se une a residuos de lisina y arginina cargados positivamente que se extienden a través de los dominios IgII de los dos receptores contiguos a la molécula FGF (Schlessinger, 2000).

La longitud total del dominio extracelular del FGFR, contiene también, un dominio IgI y un dominio de residuos ácidos conocido como "caja ácida", que funciona como conector entre IgI, e IgII. Ni el dominio IgI, ni la caja ácida, son requeridos para la unión del FGF con el receptor, de hecho la supresión del dominio IgI y la caja ácida, refuerzan la unión del complejo. Diversos estudios han demostrado, que el propósito final de estos dos factores tiene una función en la formación del complejo FGF-FGFR.

Se piensa que la caja ácida, puede unirse intra-molecularmente al sitio de unión de la heparina IgII, compitiendo así con la heparina (Plotnikov, 2000).

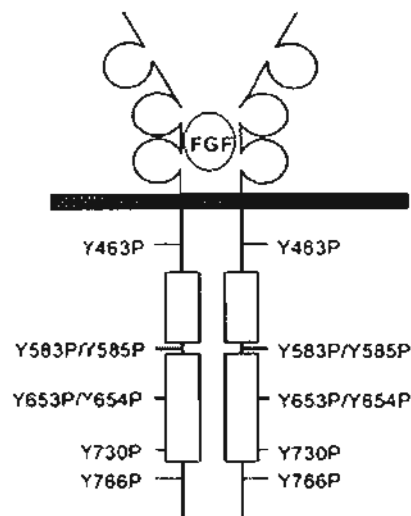


Figura 4. Estructura formada entre FGF y su receptor para su activación y dimerización.

Similarmente IgI, podría interactuar intramolecularmente, con el sitio de unión del ligando en IgII e Ig III y por lo tanto interferir en la formación del complejo FGF-FGFR. Esta autoinhibición, tendría la función de controlar la activación de FGFR independiente de FGF por algún glucosaminoglicano que son abundantes en la matriz extracelular de la célula. De acuerdo a esta teoría, el dominio extracelular de FGFR, tiene una función inhibitoria además de su papel en la activación del receptor (Schlessinger, 2000).

El modelo propuesto sobre la formación del complejo FGF-FGFR, con ayuda de moléculas similares a heparina, se lleva a cabo en dos pasos: primero la molécula de heparina recluta FGFs a la superficie de las células, incrementando así su concentración y logrando que la activación de los receptores sea más favorable termodinámicamente. El segundo paso consiste en el cambio de conformación que logra la heparina sobre el FGF y el receptor logrando así su unión y la formación del complejo. Las moléculas semejantes a heparina permanecen unidas al complejo para lograr la estabilidad y dar paso a las señalizaciones (figura 5).

Los receptores de FGFs, como otros receptores tirosin-cinasas, transmiten señales extracelulares por medio de transducción de señales asociadas a la fosforilación de residuos de tirosina, seguidos de la unión del ligando y su posterior dimerización, los receptores son capaces de fosforilar residuos de tirosina específicos propios o de algunas otras moléculas (Malarkey, 1995).

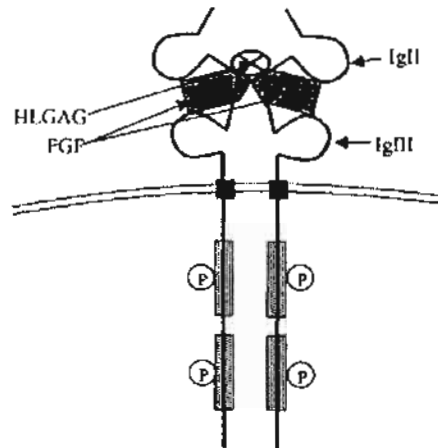


Figura 5. Formación del complejo FGF-FGFR con ayuda de una molécula similar a heparina. Fibroblast Growth Factor (FGF), HLGAG (Heparine-like glycosaminoglycan), Ig (dominios similares a inmunoglobulina).

El receptor una vez autofosforilado interactúa con proteínas adaptadoras Src de homología-2, (Src homology 2: SH-2), llamadas así debido a su similitud en la secuencia de regiones no catalíticas de la familia de las proteínas Src. Las características estructurales que determinan la especificidad de la unión a los dominios SH2 a los receptores de los FGFs, han sido recientemente identificadas; la cristalografía de rayos X demuestra, que el residuo de arginina 175, es un aminoácido crítico en la interacción del grupo fosfato con un residuo tirosina, este aminoácido es conservado en todos los grupos SH-2 (Mercer, 2004).

Los dominios SH-2 reconocen tirosinas fosforiladas y permiten a las proteínas que los presentan unirse a los receptores tirosina cinasa activados, así como a otras proteínas señales intracelulares que hayan sido fosforiladas transitoriamente sobre tirosinas. Estas proteínas adaptadoras (Src) que unen receptores activados a otras moléculas intermediadoras, tales proteínas contienen dominios SH3 compuestos de

aproximadamente 60 residuos de aminoácidos. Estas pequeñas proteínas SH adaptadoras, no presentan actividad catalítica intrínseca y actúan acoplando proteínas fosforiladas en tirosinas, como los receptores tirosina cinasa activados, con otras proteínas que no tienen dominios SH2 – SH3 propios (Klint, 1999). Los dominios SH3 son vinculados a una amplia variedad de transducción en células estimuladas con FGF-1, activando así una cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK); estas proteínas se agrupan como cinasas de residuos serina/treonina encargadas de mediar la transducción desde la superficie celular hasta el núcleo (Plotnikov, 2000).

Cascada de señalización de la vía de proteínas cinasas activadas por Mitógenos (MAPK)

Las células son capaces de reconocer y responder a estímulos extracelulares debido a la activación de moléculas que se encuentran dentro de la célula, como cascadas de señalización que permiten la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos. Todas las células eucariotas poseen vías vinculadas a MAPK, que coordinan y regulan diversas actividades celulares, tales como la expresión de ciertos genes, mitosis, metabolismo, movilidad, supervivencia, apoptosis y diferenciación (Roux, 2004).

A la fecha se conocen 4 diferentes subfamilias de las MAPK:

- a. Proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) con dos isoformas conocidas (ERK1/2)
- b. Proteínas cinasas c-Jun amino terminal (JNK) con tres isoformas (JNK1/2/3)
- c. Proteína p38 con 3 isoformas (α , β , γ , δ)
- d. Proteínas ERKs, ERK 4, ERK 5

Las vías de las MAPK mas estudiadas hasta el momento son la ERK, JNK/STAT y la familia p38. Las MAPK pueden ser activadas por una amplia variedad de diferentes estímulos, pero en general, la vía ERK es generalmente activada por factores de crecimiento y esteroides de forbol, mientras que las vías JNK y p38 responden a estímulos generadores de estrés, como estrés osmótico y radiación ionizante y citocinas (Gary, 2002).

Las subfamilias de las MAP cinasas, comparten ciertas características debido a que tienen un origen evolutivo común. Cada subfamilia está compuesta de al menos tres diferentes proteínas cinasas secuenciales (figura 6) (Chow, 2001):

1. Una proteína final denominada MAP cinasa (MAPK),
2. una proteína cinasa que precede a la MAP cinasa y la fosforila, denominada MAPKK
3. una proteína inicial cinasa que fosforila a la proteína cinasa de la MAP cinasa, denominada MAPKKK

Las MAPKKKs, son enzimas cinasas de serina-treonina que generalmente son activadas a través de la fosforilación o como resultado de su interacción con una pequeña proteína unida a GTP de la familia de las Ras/Rho en respuesta a un estímulo extracelular (Mercer, 2004).

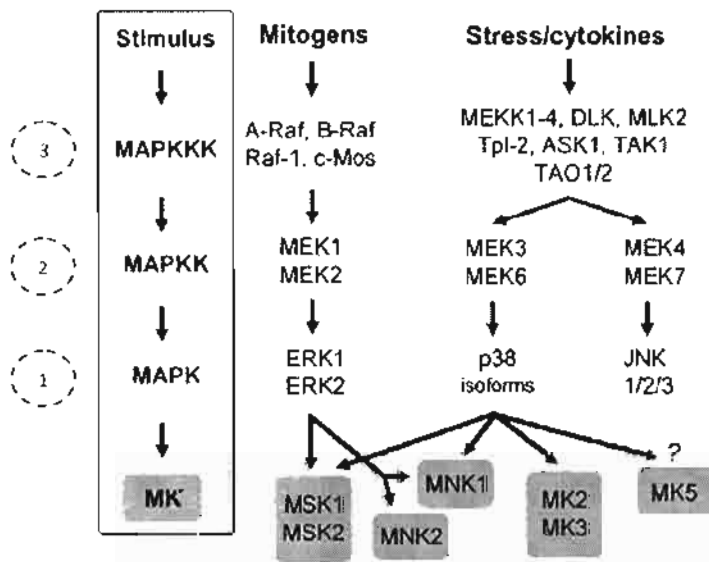


Figura 6. Las tres diferentes proteínas cinasas que conforman la cascada de señalización. En la primera columna de izquierda a derecha se muestran los nombres representativos de las proteínas cinasas, en las demás columnas se muestran las proteínas de las vías ERK, p38 y JNK respectivamente

La activación de la MAPKKK, conlleva a la fosforilación y activación de las proteínas MAPKK, que a su vez, estimula la actividad de la MAPK a través de una doble fosforilación en los residuos de treonina y tirosina en el subdominio VIII. Una vez activada, la MAPK fosforila diferentes moléculas diana en residuos de treonina, seguidos por una prolina (Malarkey, 1995). Como se mencionó anteriormente, cada subfamilia de la cascada de las MAPK, es conformada por proteínas específicas que son activadas secuencialmente, evitando de esta forma el cruzamiento entre señalizaciones. El amplio alcance que tienen las proteínas MAPK, es regulado por medio de la fosforilación sobre determinados sustratos y a su vez son reguladas a partir de otras moléculas como fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto. Las MAPKs, también catalizan la fosforilación y activación de proteínas cinasas, denominadas proteínas cinasas activadas por MAP cinasas (MKs), que representan una amplificación en la cascada de las MAPK (Seeger, 1995).

La familia de las MKs, compromete diferentes moléculas como: cinasa de la proteína S6 ribosomal de aproximadamente 90 KDa (RSKs, del inglés: Ribosomal S6 kinases), cinasas activadas por mitógenos y estrés (MSKs, del inglés: mitogen and stress activated kinases), las cinasas que interactúan con MAPK (MNKs, del inglés: MAPK-interacting kinases:), MAPK activadas por proteínas cinasas 2-3 (MAPKAP2 and 3, del inglés: MAPK-activated protein kinases 2 and 3) y MAPK activadas por proteínas 5 cinasas (MAPKAP-K5, del inglés: MAPK-activated protein kinase 5). Las MKs, son cinasas relacionadas que controlan un amplio espectro de funciones biológicas en respuesta a estímulos como los mitógenos (Roux P. 2004).

Planteamiento del Problema

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un grupo de padecimientos respiratorios que en su conjunto se definen como EPID. Estas enfermedades tienen como resultado final el depósito excesivo de moléculas de matriz extracelular en el intersticio pulmonar. Durante el desarrollo de la FPI existe una acumulación de fibroblastos en la zona dañada que conduce finalmente a una remodelación anormal de la estructura pulmonar (Selman, 2005).

Durante décadas el tratamiento de la FPI ha ido encaminado a combatir la inflamación mediante el uso de glucocorticoides asociados a inmunosupresores como la azatioprina y ciclofosfamida. Por desgracia ninguno de esos fármacos ha demostrado ser realmente útil a la hora de mejorar el pronóstico de la mayoría de los pacientes (Raugh, 1991).

Existen estudios *in vitro* que sugieren que el FGF-1 puede tener efecto modulador en la acumulación de proteínas de la matriz extracelular como la colagenasa y la colágena (Becerril, 1999). Sin embargo, la vía de señalización por medio la cual este factor produce un efecto antifibrosante en fibroblastos de pulmón no ha sido del todo dilucidada. Dicho mecanismo podría utilizarse para la realización de otros estudios *in vitro* y modelos experimentales, para confirmar los efectos antifibrosantes del FGF-1 y así proponer un posible tratamiento contra la fibrosis pulmonar idiopática.

Objetivo General

- Determinar cuáles vías de señalización utiliza el FGF-1 para regular la sobreexpresión de MMP-1 y el decremento de colágena en cultivos de fibroblastos pulmonares.

Objetivos Particulares

- Analizar mediante PCR en tiempo real el efecto del FGF-1 sobre la expresión de MMP-1, colágena y TIMP-1 en fibroblastos de pulmón.
- Determinar la vía de señalización por la cual el FGF-1 incrementa la expresión de MMP-1.
- Elucidar la vía de señalización por la cual el FGF-1 disminuye la expresión de colágena en fibroblastos de pulmón.
- Determinar las proteínas cinasas fosforiladas en la vía de señalización activada por el FGF-1 en la sobreexpresión de MMP-1.
- Examinar la fosforilación de las posibles cinasas implicadas en la vía de señalización activada por el FGF-1 en el incremento de colágena.

METODOLOGÍA

Cultivos celulares

Se trabajó con una línea celular de fibroblastos normales procedente de un paciente del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Los fibroblastos se crecieron en frascos de cultivo de 75 cm² con medio de cultivo de Ham (F-12) con penicilina [100 U/mL], estreptomycin [100mg/mL] y 10% de suero fetal bovino, incubándose con una mezcla gaseosa de 5% CO₂ / 95% aire a 37°C hasta lograr un 75% de confluencia. Posteriormente, las células se cosecharon con tripsina-EDTA 1X (tripsina 0.05 mg/mL 0.02 mg/mL de EDTA) y fueron sembradas en cajas de cultivo de 6 pozos.

Tratamiento con FGF-1 + heparina e inhibidores

Una vez que los cultivos alcanzaron el 75% de confluencia, se retiró el medio, y las células se lavaron dos veces continuas con un amortiguador de fosfatos salino (NaH₂PO₄ 0.02 M, Na₂HPO₄ 0.07M, NaCl 70mM) y posteriormente se agregaron 4 mL de medio de cultivo de Ham (F-12), sin suero fetal bovino y se dejó durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se adicionó medio nuevo sin suero con inhibidores para la vía de ERK [PD98059, 20µM], la vía de p38 [SB203580, 10 µM] y la vía de JNK/STAT [SB00125, 10 µM] (Badache, 2000; Wu, 2007; Chow, 2001; Bennett, 2001). Después de transcurridos 30 minutos con los inhibidores, a los cultivos se les agregó FGF-1 (20ng/mL) (R&D systems Minneapolis, MN), más heparina (100 µg/mL) (Grado 1-A de mucosa intestinal porcina, Sigma) y se dejaron incubando durante 24 horas.

Obtención y purificación RNA total

Transcurrido el tiempo de estimulación, se extrajo el RNA total utilizando para ello reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para cada pozo se utilizaron 800 µl del reactivo y el contenido fue transferido a tubos de 2 mL y se dejaron incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. A cada tubo se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitaron durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos a 4° C. La mezcla se separó en dos fases, una fase acuosa superior y

una fase inferior de fenol-cloroformo; la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, a la cual se le agregaron 500 µl de isopropanol y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12000 x g, por 10 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante y se agregó 800 µl de etanol al 75%, se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar las muestras sobre papel absorbente durante aproximadamente 30 minutos. El RNA se re suspendió en 10µl de agua tratada con DEPC (Dietilpircarbonato). El RNA se cuantificó por medio de un espectrófotometro UV (Spectrophotometer NanoDrop ND-1000) a una absorbancia de 260nm.

Síntesis de ADN complementario (cDNA)

El cDNA se sintetizó por medio de transcripción reversa, utilizando el kit *Advantage RT-PCR* (Clontech, Palo Alto CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se colocó 1µg de RNA de cada muestra en un tubo de 0.2 mL y se agregaron 2µl de una solución (DNAsa[500U], amortiguador 10X [1µl/muestra]), aforándose a 10 µl con agua DEPC. A cada una de las muestras, se agitó y centrifugó. Posteriormente, se incubaron las muestras por 15 min a temperatura ambiente y se añadió EDTA (1mM) y se incubaron las muestras por 10 min a 65°C y se añadieron 9µl a cada una de las muestras, de una solución (amortiguador 5X para la enzima M-MLV [4µl/muestra], H₂O libre de nucleasas [4µl/muestra], 2.5 µM de hexámeros al azar, 500 µM de cada deoxinucleótido (dNTPs) enzima transcriptasa reversa termoestable (RT-MMLV) (1 µl de M-MLV de 200 U/µl /muestra) volumen final de 15µl) y fueron incubadas en un termociclador por 60 min a 37°C, al salir las muestras del termociclador fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

PCR en Tiempo Real

Una vez sintetizado el cDNA se procedió a realizar PCR en tiempo real, utilizando el sistema i-Cycler iQ Detection System (BioRad, Hercules, CA). La reacción de amplificación se llevó a cabo con la técnica multiplex utilizando sondas Taqman obtenidas de Applied Biosystems marcadas con fluoróforos FAM (Sonda r18S [4333760F, eukaryotic 18SrRNA endogenous control], MMP-1 [HS 00899660_g1], colágena [HS 01076777_m1], TIMP-1 [NM00-2421]).

La reacción de PCR en tiempo real fue realizada en las siguientes condiciones: 15 µl de mezcla reacción con los siguientes componentes a una concentración final de 2 mM MgCl₂, amortiguador de la enzima 10X, 0.2 mM dNTPs, 10 µM Sonda Taqman, 1.25U Taq platinum, 2 µl de cDNA y agua libre de nucleasas necesaria para 15 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 94°C durante 2 minutos seguido de 40 ciclos de 30 segundos en cada una de las siguientes temperaturas, desnaturalización a 94°C, alineamiento a 60°C, y elongación a 72°C, seguido de un paso final de elongación de 72 °C durante 5 minutos. Se utilizó una curva estándar hecha a partir de diluciones seriales para cada uno de los genes (r18S, MMP-1, colágena, TIMP-1) y se amplificaron con los iniciadores específicos de cada gen de interés. Tanto los estándares como los cDNAs fueron amplificados por duplicado. Las ecuaciones de las curvas estándar se calcularon refiriéndose al ciclo umbral (Ct), mientras que los resultados se expresaron como el número de copias de cada gen normalizado con el número de copias del RNA ribosomal 18S.

Extracción de proteínas

Una vez transcurrido el tiempo de estimulación se procedió a extraer las proteínas retirando el medio Ham, los pozos de cultivo se lavaron 2 veces con amortiguador salino frío y las células se lisaron con un amortiguador de lisis (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, NP40 1%) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (1 nM PMSF, 1 mg/mL de pepstatina y 1 mg/ mL de leupeptina) raspando las cajas de cultivo sobre hielo. El extracto de células se transfirió a tubos de 1.5 mL y entonces se sonicaron (4 pulsos de 20 segundos a 60 MHz), posteriormente los homogeneizados se centrifugaron a 14 000 rpm por 20 min a 4° C, y se recuperó el sobrenadante que se separo en 4 alícuotas y fue almacenado (-70°C) hasta su uso. Se evaluó la concentración de proteínas con el reactivo BioRad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA) del medio condicionado concentrado y de las muestras de lisis celular extrapolando el resultado obtenido en una curva estandarizada de albúmina.

Análisis por Western Blot.

Las proteínas se descongelaron y mezclaron (V/V) con amortiguador de Laemmli (0.5 M Tris-HCl pH 6.8 -SDS 3%-glicerol-azul de bromofenol 0.05%, 2-B-mercaptoetanol 5%). Se cargaron 30µg de proteína total de cada una de las muestras y fueron fraccionadas en geles SDS-PAGE al 12% bajo condiciones reductoras calentándose a 80°C, los geles se corrieron a un voltaje de 150 V durante una hora. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (polivinil difloruro) que fue humedecida en metanol por 1 minuto y luego se equilibrio con amortiguador de transferencia durante 30 minutos junto con el gel. La transferencia del gel a la membrana fue a 100 V durante 45 minutos con una cámara para transferencia semi-húmeda de geles (BioRad). Los sitios inespecíficos de unión en la membrana, se bloquearon por incubación con leche descremada al 5% en amortiguador TBS-T (10 mM Tris base, pH 8.0, 150 mM de NaCl, y 0.05% Tween 20) durante una hora a temperatura ambiente. Después las membranas se incubaron 18 horas a 4°C con el anticuerpo primario específico para cada una de las proteínas a estudiar (1 µg/mL Ac MMP-1, 2 µg/mL Ac MAPK p44/42 fosforilado, 2 µg/mL Ac MAPK p42/p44) en amortiguador de fosfatos salino con leche descremada 3%. Transcurrido el tiempo indicado con el anticuerpo primario, se lavó la membrana por 4 tiempos de 15 minutos cada uno con TBS-T. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (1:500 anti-rabbit-HRP) diluido en TBS-T con BSA 1% a la dilución previamente señalada, se mantuvo en agitación constante a 37° C por una hora. Posteriormente la membrana fue lavada por 4 tiempos de 15 minutos con amortiguador TBS-T para después revelar la marca con el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL exponiendo la membrana con una placa fotográfica para rayos X (X-OMAT; Eastman Kodak) por 5 minutos.

Análisis Estadístico

Todos los resultados son expresados como la media (\pm) la desviación estándar. El análisis estadístico se desarrolló usando el paquete estadístico SPSS v.15. Se realizó un análisis de varianza de una vía para determinar la diferencia entre los grupos de cada estudio, así como la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Un valor para p menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Análisis mediante PCR en tiempo real de la expresión del gen constitutivo r18S en fibroblastos de pulmón

Se calculó el número de copias del gen ribosomal 18S (r18S), realizándose una curva estándar por medio de diluciones seriales desde 1×10^9 , 1×10^7 , 1×10^5 , 1×10^4 por duplicado. En la tabla 3, pueden observarse los resultados obtenidos a partir de la curva estándar realizada mediante PCR en tiempo Real, la gráfica 1 muestra su representación gráfica.

TABLA 3. Curva estándar del gen r18S

No. De copias (r18S)	No. De muestra	Ciclo umbral (Ct)	\bar{x} Ct
1×10^9	1	14.79	14.99
	2	15.19	
1×10^7	1	22.68	22.26
	2	21.83	
1×10^5	1	29.1	28.72
	2	28.33	
1×10^4	1	31.6	31.89
	2	32.18	

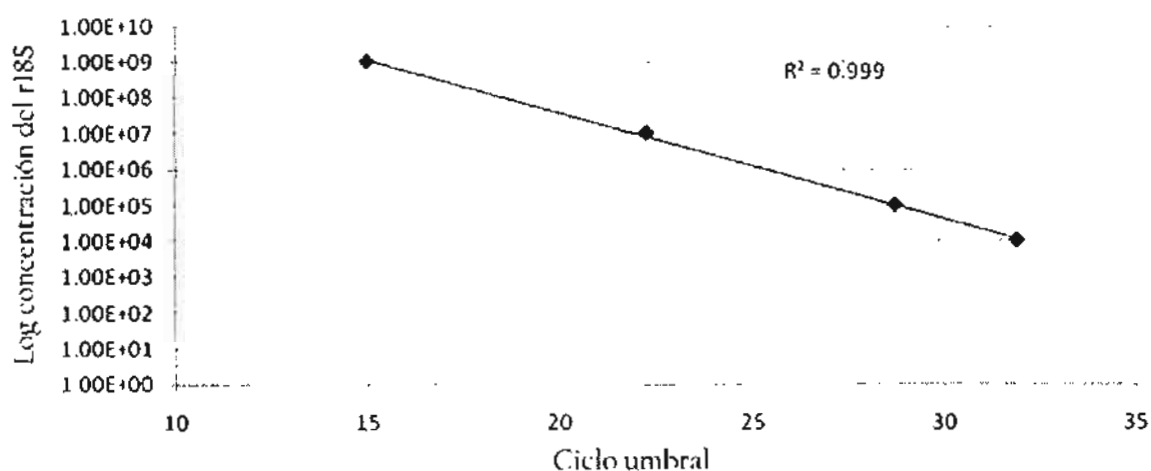


TABLA 4. Datos obtenidos del r18S de cada una de las muestras problema

El número de copias del r18S de cada una de las muestras problema (tratadas y control) fue determinado a partir de la extrapolación del ciclo umbral de las muestras contra el ciclo umbral (Ct) de la curva estándar anteriormente descrita, cada muestra se

analizó por triplicado. El número de copias del r18S de cada una de las muestras, se utilizó para normalizar el número de copias del resto de los genes analizados (MMP-1, colagenasa, TIMP-1). Las ecuaciones de las curvas estándar se calcularon refiriéndose al ciclo umbral (Ct), mientras que los resultados se expresaron como el número de copias del gen (Tabla 4).

<i>Muestra/tratamiento</i>	<i>No. De muestra</i>	<i>Ciclo umbral (Ct)</i>	\bar{x} <i>Ct</i>	<i>No. de copias (r18S) de muestras problema</i>
Control	1	22.45	22.49	6.82X10 ⁶
	2	22.49		
	3	22.52		
FGF-1 + Heparina	1	31.93	30.92	2.41X10 ⁴
	2	30.55		
	3	30.29		
Heparina	1	29.21	29.01	6.89X10 ⁴
	2	28.6		
	3	29.21		
Inhibidor PD98059	1	22.11	22.46	7.15X10 ⁶
	2	22.32		
	3	22.95		
Inhibidor UO126	1	26.1	24.04	6.5X10 ⁵
	2	25.79		
	3	20.22		
Inhibidor SB203580	1	28.22	28.9	7.05X10 ⁴
	2	28.88		
	3	29.6		
Inhibidor SP00125	1	23.84	24.05	2.38X10 ⁶
	2	24.36		
	3	23.95		

Se analizó el número de copias en la expresión genes estudiados (colágena, MMP-1 y TIMP-1) en cada una las muestras estimuladas con FGF-1 más heparina para determinar su efecto; adicionalmente se analizaron muestras estimuladas con diferentes inhibidores de las rutas de las MAPK para determinar la vía utilizada. Para ello se cuantificó el número de copias del gen r18S de cada una de las muestras problema (descrito previamente) y se obtuvo una relación con respecto a cada uno de los genes estudiados, los datos obtenidos se describen a continuación.

Análisis mediante PCR en tiempo real del efecto del FGF-1 más heparina sobre la expresión de *colágena*

Para determinar la cantidad de colágena en las muestras problema, se realizó una curva estándar por duplicado de la expresión del gen colágena (Tabla 5) y mediante los datos obtenidos, se obtuvo el número de copias del gen en cada una de las muestras problema (Tabla 6).

TABLA 5. Curva estándar de colágena

Número de copias del gen colágena	No. de muestra	Ciclo umbral (Ct)	\bar{x} Ct
1×10^8	1	15.06	14.98
	2	14.89	
1×10^6	1	26.75	26.18
	2	25.62	
1×10^5	1	30.48	29.74
	2	29	
1×10^3	1	39.84	44.69
	2	49.54	
1×10^1	1	43.14	42.56
	2	41.99	

Se obtuvieron las cantidades de colágena en relación al gen r18S para obtener los datos normalizados respecto a cada una de las muestras, posteriormente se calcularon las magnitudes de las muestras tratada con respecto al control (tabla 7). Se observa un aumento en el número de copias de colágena en la muestra estimulada con el FGF-1 más heparina y heparina, respecto al resto de las muestras. Dentro de las muestras estimuladas con inhibidores, la muestra estimulada con el inhibidor de la vía p38 es la que presenta menos cambios. Finalmente los resultados de las magnitudes fueron graficados (gráfica 2).

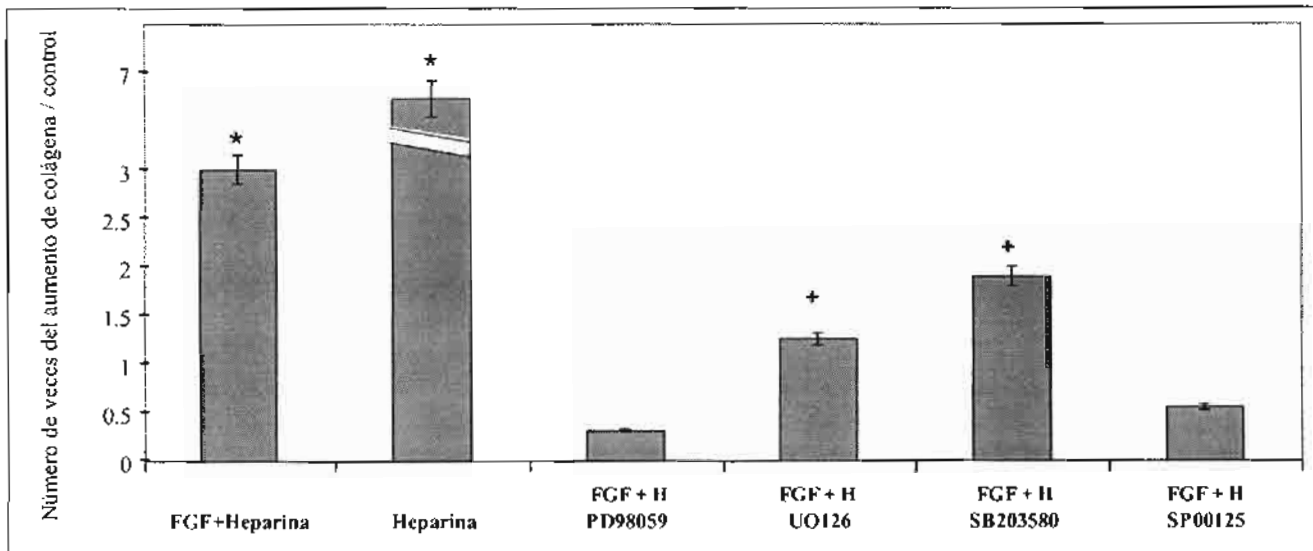
TABLA 6. Número de copias en la expresión de colágena de cada una de las muestras

Muestra/tratamiento	No. de muestra	Ciclo umbral (Ct)	\bar{x} Ct	No de copias(colágena)
Control	1	19.86	19.84	2.00E+07
	2	19.82		
FGF-1 + Heparina	1	28.27	27.91	2.12E+05
	2	27.55		
Heparina	1	25.08	24.63	1.38E+06

	2	24.18		
Inhibidor PD98059	1	20.65	21.21	6.64E+06
	2	21.78		
Inhibidor UO126	1	23.9	23.63	2.37E+06
	2	23.35		
Inhibidor SB203580	1	26.54	26.81	3.91E+05
	2	27.08		
Inhibidor SP00125	1	22.54	22.78	3.82E+06
	2	23.02		

TABLA 7. Datos normalizados de colágena y cálculo de magnitudes respecto al control

	Control	FGF+Heparina	Heparina	PD98059	UO126	SB203580	SP00125
Colagena	2.00E+07	2.12E+05	1.38E+06	6.64E+06	2.37E+06	3.91E+05	3.82E+06
r 18S	6.82E+06	2.41E+04	6.98E+04	7.15E+06	6.50E+05	7.05E+04	2.38E+06
Colagena/r 18S	2.92E+00	8.79E+00	1.97E+01	9.29E-01	3.65E+00	5.55E+00	1.61E+00
Magnitudes		3.0060	6.738	0.317	1.247775	1.8982	0.549
DESVEST		0.7890	2.271	0.0547	0.245	0.438	0.1155



Gráfica 2. Número de copias totales de colágena de las muestras tratadas. * $p < 0.05$ comparados respecto al control, + $p < 0.05$ comparados contra las muestras tratadas con algún inhibidor

Análisis mediante PCR en tiempo real del efecto del FGF-1 sobre la expresión de MMP-1

Para determinar la expresión del gen MMP-1 en cada una de las muestras tratadas, primero se realizó una curva estándar por duplicado de MMP-1 (tabla 8), mediante los datos obtenidos, se obtuvo el número de copias del gen en cada una de las muestras problema (tabla 9).

TABLA 8. Curva estándar de MMP-1

Número de copias del gen MMP-1	No. De muestra	Ciclo umbral (Ct)	\bar{x} Ct
1×10^8	1	25.84	24.74
	2	35.2	
1×10^6	1	36.75	34.78
	2	22.85	
1×10^5	1	34.35	35.73
	2	34.71	

TABLA 9. Número de copias en la expresión del gen MMP-1 de cada una de las muestras

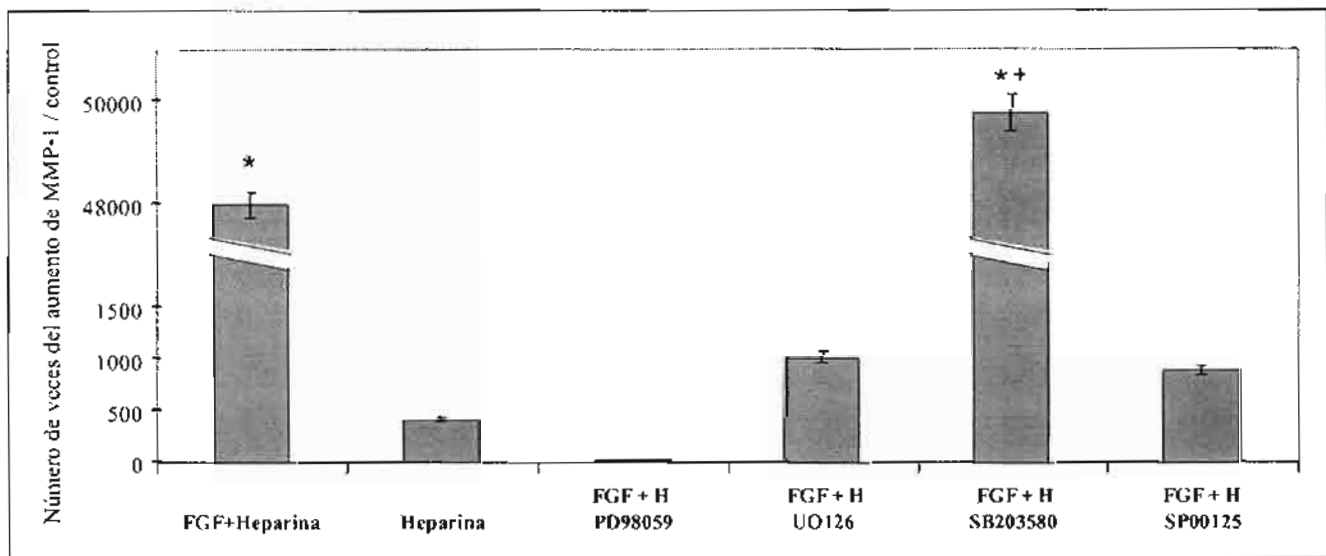
Muestra/tratamiento	No. De muestra	Ciclo umbral (Ct)	\bar{x} Ct	No de copias(MMP-1)
Control	1	33.95	33.91	5.76×10^5
	2	33.87		
FGF-1 + Heparina	1	25.61	25.08	9.74×10^7
	2	24.54		
Heparina	1	32.19	31.51	2.47×10^6
	2	30.83		
Inhibidor PD98059	1	27.5	27.75	2.01×10^7
	2	28		
Inhibidor UO126	1	26.46	26.02	5.57×10^7
	2	25.58		
Inhibidor SB203580	1	22.87	23.12	2.91×10^8
	2	23.36		
Inhibidor SP00125	1	23.69	23.94	1.81×10^8
	2	24.19		

Se obtuvieron las cantidades de MMP-1 en relación a la expresión del gen r18S para obtener los datos normalizados respecto a cada una de las muestras, posteriormente se calcularon las magnitudes de las muestras tratada con respecto al control (Tabla 10) y los resultados de las magnitudes fueron graficadas (gráfica 3). Se observa un aumento de MMP-1 en la muestra estimulada con FGF-1 más heparina con respecto al resto de las muestras, mientras que dentro de las muestras estimuladas con algún

inhibidor, dentro de las muestras estimuladas con inhibidores, la muestra estimulada con el inhibidor de la vía p38 es la muestra que presenta menos efectos.

TABLA 10. Datos normalizados de MMP-1 y cálculo de magnitudes respecto al control

	Control	FGF+Heparina	Heparina	PD98059	UO126	SB203580	SP00125
MMP-1	5.76E+05	9.77E+07	2.47E+06	2.02E+07	5.57E+07	2.91E+08	1.81E+08
r 18S	6.82E+06	2.41E+04	6.98E+04	7.15E+06	6.50E+05	7.05E+04	2.38E+06
MMP-1/r18S	0.0843	4048.1137	35.3164	2.8197	85.7346	4123.2747	76.1361
Magnitudes		47999.54007	418.7562	33.4349	1016.578	48890.74	902.7659
DESVEST		1820.7127	206.0481	7.8013	322.6413	1505.68	213.4601



Gráfica 3. Número de copias totales de MMP-1 en las muestras tratadas. * $p < 0.05$ comparados respecto al control, + $p < 0.05$ comparados contra las muestras estimuladas con algún inhibidor

Análisis mediante PCR en tiempo real del efecto del FGF-1 sobre la expresión de TIMP-1

Para determinar la expresión del gen TIMP-1 en las muestras tratadas, se realizó una curva estándar por duplicado de TIMP-1 (tabla 11) y mediante los datos obtenidos, se obtuvo el número de copias de en cada una de las muestras problema (Tabla 12).

TABLA 11. Curva estándar de TIMP-1

Número de copias del gen TIMP-1	Ciclo umbral (Ct)
1×10^{10}	11.22
1×10^9	9.91
1×10^7	17.18
1×10^5	24.37
1×10^3	30.66
1×10^2	34.4

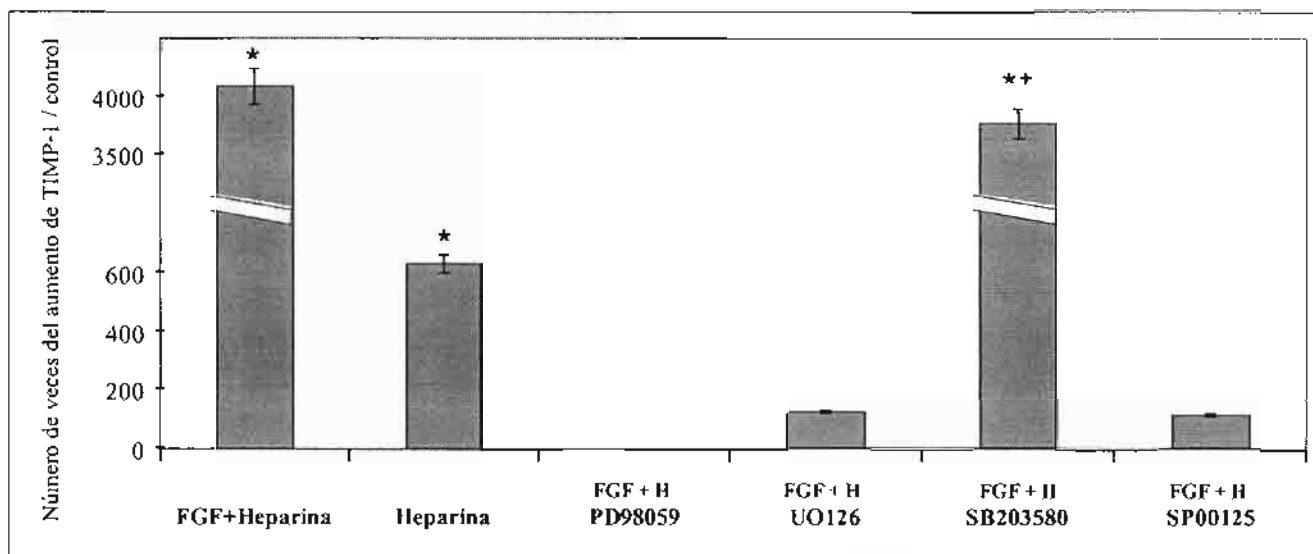
TABLA 12. Número de copias de TIMP-1 de cada una de las muestras tratadas

Muestra/tratamiento	No. De muestra	Ciclo umbral (Ct)	\bar{x} Ct	No de copias(TIMP-1)
Control	1	19.1	19.1	3.55E+06
	2	19.1		
FGF-1 + Heparina	1	15.3	15.3	5.31E+07
	2	15.3		
Heparina	1	17.5	16.7	2.29E+07
	2	15.9		
Inhibidor PD98059	1	17.6	17.45	1.15E+07
	2	17.3		
Inhibidor UO126	1	15.7	15.65	4.14E+07
	2	15.6		
Inhibidor SB203580	1	14	13.95	1.39E+08
	2	13.9		
Inhibidor SP00125	1	13.9	13.95	1.39E+08
	2	14		

Se obtuvieron las cantidades del TIMP-1 en relación al r18S para obtener los datos normalizados respecto a cada una de las muestras, posteriormente se calcularon las magnitudes de las muestras tratada con respecto al control (tabla 13). Finalmente los resultados de las magnitudes fueron graficadas (gráfica 4). Se observa un aumento de TIMP-1 en la muestra estimulada con FGF-1 más heparina, heparina y FGF-1 más heparina (SB203580) respecto al resto de las muestras, mientras que dentro de las muestras estimuladas con algún inhibidor, dentro de las muestras estimuladas con inhibidores, la muestra estimulada con el inhibidor de la vía p38 (SB203580) es la muestra que presenta menos efectos.

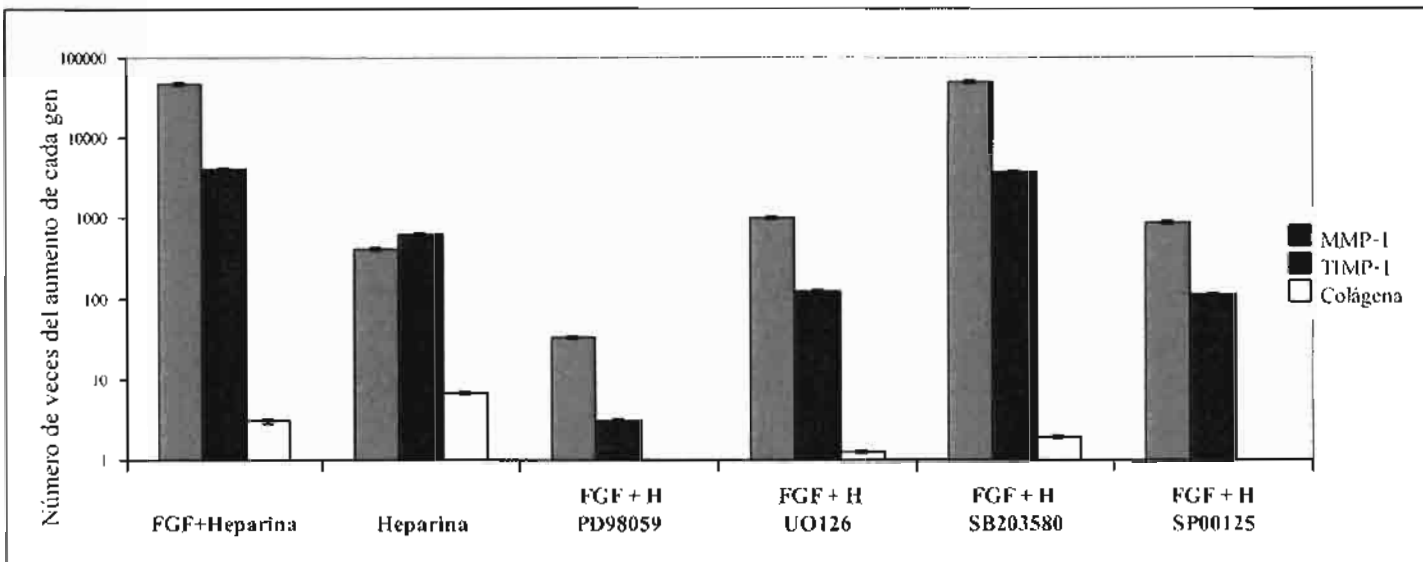
TABLA 13. Datos normalizados en la expresión del gen TIMP-1 v cálculo de magnitudes respecto al control

	Control	FGF+Heparina	Heparina	PD98059	UO126	SB203580	SP00125
TIMP-1	3.55E+06	5.31E+07	2.29E+07	1.15E+07	4.14E+07	1.39E+08	1.39E+08
r 18S	6.82E+06	2.41E+04	6.98E+04	7.15E+06	6.50E+05	7.05E+04	2.38E+06
MMP-1/r18S	5.20E-01	2.20E+03	3.27E+02	1.62E+00	6.37E+01	1.97E+03	5.84E+01
Magnitudes		4236.3229	630.2533	3.110331	122.6666	3796.198	112.5032
DESVEST		156.0998	459.1961	0.468139	6.1750	191.0998	5.663389



Gráfica 4. Número de copias totales de TIMP-1 en las muestras tratadas. * p<0.05 comparados respecto al control, + p<0.05 comparados contra las muestras estimuladas con algún inhibidor.

Posteriormente, se compararon los datos obtenidos en la expresión de los tres diferentes genes estudiados de cada una de las muestras (gráfica 5) para determinar el aumento de cada uno de los genes en relación al resto. En la gráfica 5, puede observarse que todas las muestras estimuladas con FGF-1 más heparina presentan un aumento en la expresión de cualquiera de los tres genes estudiados (colágena, MMP-1, TIMP-1) mientras que la muestras tratadas con inhibidor de la vía p38 son las que presentan menos cambios respecto a las muestras tratadas con FGF-1 más heparina dentro de las muestras estimuladas con algún inhibidor.



Gráfica 5. Comparación en la expresión de MMP-1, colágena y TIMP-1 en fibroblastos normales de pulmón estimulados con el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF-1) + heparina e inhibidores. NOTA. El eje "y" se encuentra expresado en escala logarítmica.

Análisis de proteínas por Western blot

Se llevó a cabo un análisis por Western blot para evaluar el efecto del FGF-1 en fibroblastos normales de pulmón sobre la producción de colagenasa, así como para analizar la posible vía de señalización utilizada para su efecto. En la figura 7, puede apreciarse un aumento considerable de MMP-1 en la muestra estimulada con el FGF-1 + heparina comparado contra el control, mientras que se observa una disminución de la señal de la proteína MMP-1 en el carril de la muestra estimulada con FGF-1 + heparina junto con el inhibidor de la vía ERK (PD98059). Es decir existe un aumento en la producción de colagenasa intersticial en muestras estimuladas con FGF-1 + heparina y sin embargo no se observa la misma intensidad en aquella muestra donde adicionalmente se agrego un inhibidor de la vía ERK. No se observo ningún cambio sobre la marca de MMP-1 en la muestra que solamente fue estimulada con el inhibidor PD98059.

Por otra parte, se analizó en cada una las muestras tratadas, la proteína p42 total de la vía ERK de las MAPK y la proteína fosforilada (p42-p) para determinar si es una de las vías utilizadas para el aumento de colágenasa en fibroblastos normales de pulmón.

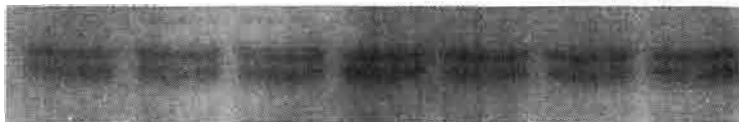
Figura 7. Detección de MMP-1 por Western-blot



carril 1	carril 2	carril 3	carril 4	carril 5
control	FGF + heparina	FGF + heparina PD98059	PD98059	MMP-1 control

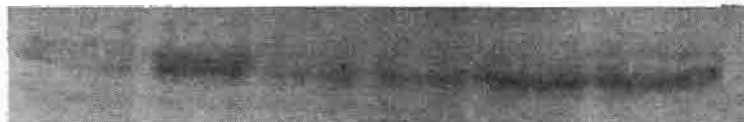
En la figura 8, se observa una similitud en la marca de la proteína p42 en las muestras estimuladas con FGF-1 + heparina y heparina respecto al control. En cambio existe un aumento de las muestras que han sido estimuladas con FGF + heparina + algún inhibidor de la vías de las MAPK. Esto puede deberse a que probablemente las muestras estimuladas con el FGF-1 utilizan la vía ERK y fosforilan la proteína p42 para poder seguir con esta ruta.

Figura 8. Detección de la proteína p42/44 por Western-blot



carril 1	carril 2	carril 3	carril 4	carril 5	carril 6	carril 7
control	FGF + heparina	Heparina	FGF + Heparina + PD98059	FGF + Heparina + UO126	FGF + Heparina + S8203580	FGF + heparina + SP00125

Figura 9. Detección de la proteína p42/44 fosforilada por Western-blot



carril 1	Carril 2	carril 3	carril 4	carril 5	carril 6
control	FGF-1 + heparina	PD98059	UO126	FGF-1 + heparina PD98059	FGF-1 + heparina UO126

La figura 9 muestra el aumento de la marca de la proteína p42 fosforilada en la muestra que fue estimulada con el FGF-1 + heparina, mientras que en aquellas muestras que fueron estimuladas de la misma forma más algún inhibidor de la vía ERK (PD98059 –

UO126) presentan una disminución de la marca (carril 5-6). Las muestras estimuladas solamente con inhibidores de la vía ERK (carril 3-4) no presentan cambio alguno.

Discusión de Resultados

Se ha sugerido que el factor ácido de crecimiento de fibroblastos (FGF-1) con heparina puede modular la relación entre las proteínas que conforman la matriz extracelular pulmonar, ya que aumenta la expresión de colagenasa intersticial (MMP-1) en fibroblastos de pulmón (Becerril, 1999). También se ha encontrado que tanto el FGF-1, como su receptor (RFGF-1) se sobreexpresan durante el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática (Barrios, 1997).

Gracias a la técnica de PCR en tiempo real se demostró que existe un aumento significativo en la expresión de MMP-1 (gráfica 3) en las muestras estimuladas con FGF-1 más heparina comparada contra la muestra control (FGF-1+H: 47999.5 ± 1820.7127 ; $p < 0.05$) Ello corrobora los resultados encontrados previamente (Becerril, 1999; Selman, 2001). Sin embargo en la presente investigación se demostró que existe de igual manera un aumento en la expresión de colágena tipo I y de TIMP-1; sin embargo su expresión se ve ampliamente rebasada por la expresión de MMP-1.

Se demostró que la expresión de colágena aumentaba en aquellas muestras que fueron expuestas al FGF-1 más heparina (gráfica 2) (respecto a la muestra control FGF-1+H: 3.0060 ± 0.7890 ; $p < 0.05$), lo mismo que la expresión del TIMP-1 (gráfica 4) (FGF-1+H: 4236.3 ± 156.1 ; $p < 0.05$), sin embargo la expresión de estos dos genes no fue tan amplia como la expresión de MMP-1 bajo las mismas condiciones. Esto implica que la degradación de colágena es llevada a cabo en gran parte por la MMP-1, aún tomando en cuenta que existe un pequeño incremento de colágena y de TIMP-1.

Existe una diferencia significativa entre la cantidad de colágena de las muestras estimuladas con FGF-1 más heparina y adicionalmente con un inhibidor de la ruta ERK o de la ruta JNK de las MAPK, contra las muestras estimuladas con FGF-1 más heparina y un inhibidor de la ruta p38 (gráfica 2) (FGF-1+H/PD: 0.317 ± 0.054 ; FGF-1+H/UO: 1.24 ± 0.24 ; FGF-1+H/SP: 0.549 ± 0.115 vs FGF-1+H/SB: 1.898 ± 0.438 ; $p < 0.05$).

El mismo efecto se muestra en la expresión de MMP-1 (gráfica 3) (FGF-1+H/PD: 33.43496 ± 7.801 ; FGF-1+H/UO: 1016.578 ± 322.641 ; FGF-1+H/SP: 902.765 ± 213.406 vs FGF-1+H/SB: 48890.74 ± 11505.68 ; $p < 0.05$) y del TIMP-1 (gráfica 4) (FGF-1+H/PD: 3.11 ± 0.468 ; FGF-1+H/UO: 122.66 ± 6.175 ; FGF-1+H/SP: 112.50 ± 5.663 vs FGF-1+H/SB: 3796.198 ± 198.09 ; $p < 0.05$).

Esto indica que probablemente el aumento de MMP-1, de colágena y TIMP-1 en fibroblastos estimulados con el FGF-1 más heparina, se lleva a través de la cascada de señalización de las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK) utilizando principalmente las ruta de proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y la vía de las cinasas c-Jun amino terminal (JUNK/STAT).

En el análisis de proteínas a partir de la técnica de Western blot, se demostró con lo referente a la colagenasa intersticial, que existe un aumento considerable de colagenasa en la muestra que fue estimuladas con el FGF-1 más heparina y una disminución en aquellas muestras en las que adicionalmente se agregó el inhibidor de la vía ERK con respecto al control.

Se analizaron la proteínas cinasas fosforiladas de la vía ERK (p-42-p) para determinar si era una de las vías utilizadas para el aumento de MMP-1 mediante el estímulo con FGF-1 más heparina y se demostró que existe un aumento de la proteínas fosforiladas en la muestra estimulada con FGF-1 más heparina, mientras que se muestra una disminución en la fosforilación de las proteínas cinasas en aquellas muestras que fueron adicionalmente tratadas con inhibidores de la vía ERK.

Esto confirma los resultados encontrados mediante la técnica de PCR en tiempo real que aquellas muestras estimuladas con el FGF-1 más heparina, presentan un aumento en la expresión de MMP-1 respecto a aquellas muestras que no fueron estimuladas, adicionalmente, se corrobora que el aumento de colagenasa intersticial, colágena y de TIMP-1 se lleva a cabo mediante la utilización de las rutas ERK y JUNK/STAT de la cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-1) junto con la heparina, aumenta la expresión de colagenasa, colágena y TIMP-1 respecto al control en fibroblastos de pulmón normales.

La expresión de MMP-1 aumentó en una magnitud de 48000 veces en fibroblastos de pulmón normales estimulados con FGF-1 más heparina respecto a fibroblastos no estimulados.

Contrario a lo reportado previamente (Beceril, 1999), la expresión del gen de colágena aumenta en fibroblastos de pulmón estimulados con FGF-1 más heparina. La expresión de colágena aumentó en una magnitud de 3 veces en fibroblastos de pulmón normales estimulados con FGF-1 más heparina respecto a fibroblastos no estimulados.

La expresión de TIMP-1 aumentó en una magnitud de 4000 veces en fibroblastos de pulmón normales estimulados con FGF-1 más heparina respecto a fibroblastos no estimulados.

El aumento en la expresión de MMP-1, colágena y TIMP-1 en fibroblastos normales de pulmón estimulados con FGF-1 más heparina utiliza la vía ERK y la vía JNK/STAT de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK).

El aumento en la expresión de MMP-1 por medio de FGF-1 más heparina en fibroblastos de pulmón, se ve reducida cuando se estimula además con un inhibidor de la vía ERK (PD98059, UO126) o de la vía JNK/STAT (SP00125), sin embargo no se observa el mismo efecto cuando se utiliza un inhibidor de la vía p38 (SB203580).

El aumento en la expresión de colágena por medio de FGF-1 más heparina en fibroblastos de pulmón, se ve reducida cuando se estimula además con un inhibidor de la vía ERK (PD98059, UO126) o de la vía JNK/STAT (SP00125), sin embargo no se observa el mismo efecto cuando se utiliza un inhibidor de la vía p38 (SB203580).

El aumento en la expresión de TIMP-1 por medio de FGF-1 más heparina en fibroblastos de pulmón, se ve reducida cuando se estimula además con un inhibidor de

la vía ERK (PD98059, UO126) o de la vía JNK/STAT (SP00125), sin embargo no se observa el mismo efecto cuando se utiliza un inhibidor de la vía p38 (SB203580).

Los fibroblastos de pulmón estimulados con FGF-1 junto con la heparina, fosforilan proteínas (p44) utilizadas en la vía ERK de la cascada de señalización de las MAPK para incrementar la expresión de MMP-1, esto indica que es al menos una de las vías utilizadas de las MAPK para el aumento en la expresión de este gen.

El FGF-1 junto con la heparina más el inhibidor de la vía ERK (PD98059), disminuye la fosforilación de la proteína p44.

Estos resultados demuestran que fibroblastos estimulados con FGF-1 más heparina aumentan la expresión de MMP-1, colágena y TIMP-1 por medio de la fosforilación de proteínas de las vías de señalización ERK y JNK/STAT de las MAPK; sin embargo el aumento de en la expresión de los genes de colágena y TIMP-1 resultan ampliamente rebasados por el aumento en la expresión de MMP-1, lo cual explica las propiedades antifibrosantes del FGF-1 más heparina sobre fibroblastos de pulmón normales.

Bibliografía

- Agostini C., y Gurrieri C. (2006) Chemokine/Cytokine Cocktail in Idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 3: 357-363.
- Akamine A., Raghu G. y Narayanan S. (1992) Human lung subpoblations with different C1q binding and functional properties. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6: 382-389.
- Ancochea J., Antón E. y Casanova A. (2004) Nuevas estrategias terapéuticas en la fibrosis pulmonar idiopática. *Arch Bronconeumol*, 40 (Supl 6): 16-22.
- Atkinson S., Crabbe T. y Cowell S. (2000) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 269: 12692-12700.
- Arenas S. y Zurbaran C. (2004) La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte*, 16: 9-18.
- Baker A., Edwards D. y Murohy G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological action and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, 115: 3719-3727.
- Barrios .R, Pardo A. y Selman M. (1997) Upregulation of acidic fibroblast growth factor (FGF-1) during the development of experimental lung fibrosis. *Am J Physiol*, 273: 451-458.
- Becerril C., Pardo A., Montaña M., Ramos C., Ramírez R. y Selman M. (1999) Acidic fibroblast growth factor induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblast. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 1020-1027.
- Bennett B., Sasaki T. y Murray B. (2001) SP00125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun-Nterminal kinase. *PNAS*, 98(24): 13681-13686.
- Badache A. y Hynes N. (2000) Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop increases migration of T47D breast cancer cells. *Cancer Res*, 61: 383-391.
- Cuadros M., Cano L., Cook A., Pérez A., y Molina A. (2004) Expresión de metaloproteinasas y sus inhibidores de tejido en un modelo murino de fibrosis pulmonar. *Med UNAB*, 7(19):9-14.
- Chow S., Patel H. y Hedley D. (2001) Measurement of MAP kinase activation by flow cytometry using phospho-specific antibodies to MEK and ERK: Potential for pharmacodynamic monitoring of signal transduction inhibitors. *Clin Cyt*, 46:76-78.

- Dytiatov C y Schachner M. (2003) Extracellular Matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature*, 4: 456-458.
- Eruman M. y Litovsky S. (2007) Aspectos fisiopatológicos y moleculares en la remodelación de la matriz extracelular vascular. *Rev Argentina de cardiología*, 75(2): 137-143.
- Gauldie J., Jordana M. y Cox G. (1993) Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax*, 48: 931-935.
- Gary L. y Razvan L. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298: 1911-1912.
- Ghosh A. (2002) Factors Involved in the regulation of type I collagen gene expression: Implication in fibrosis. *Exp Biol Med*, 227(5): 301-314.
- Gomez D., Alonso D., Yoshiji D. y Thorgeirsson U. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. *Eur J Cell Biol*, 74: 111-122.
- Hemmann S., Graj J., Roderfeld M. y Roeb E. (2007) Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis a systemic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hep*, 40: 955-975.
- Iozzo V. (1998) Matrix proteoglycans: From Molecular Design to Cellular Function. *Ann Rev Biochem*, 67: 609-652.
- Jinnin M., Ihn H., Mimura Y., Asano Y., Yamane., y Tamaki K. (2005) Matrix metalloproteinases-1 up-regulation by hepatocyte growth factor in human dermal fibroblasts via ERK signaling pathway involves Ets1 and Fli1. *Nuclei Acid Research*, 33(11): 3540-3549.
- Kadler E., Holmes D. y Trotter J. (1997) Collagen fibril formation. *Biochem J*, 316: 1-11.
- Klint P. y Claesson-Welsh L. (1999) Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *J Biol Chem*, 28: 165-177.
- Kuhn C. y McDonald J. (1991) The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *J Pathology*, 128(5): 1257-1260.
- Malarkey K., Bellham C., Paul A., Graham A., McLees A. y Scott P. (1995) The regulation of tyrosine kinases signaling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem*, 309: 361-375.

- Matsumura S. (2004) A single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter is correlated with histological differentiation of gastric cancer. *J Res Onc*, 130(5): 259-265.
- Mercer B., Kolesnikova N., Sonett J. y Armiento J. (2004) Extracellular regulates kinase/mitogen activated kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. *J Biol Chem*, 279(17): 17690-17696.
- Montero C. (2006) Nuevos tratamientos en la fibrosis pulmonar Idiopática. *Arch Bronchoneumol*, 42(1): 1-2.
- Nagase H. y Woessner F. (1999) Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*, 30: 21491-21494.
- Pardo A., Selman M., Ramírez R., Ramos C., Montaña M., Stricklin. y Raghu G. (1992) Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs. *Chest*, 102: 1085-1089.
- Plotnikov A., Hubbard S. y Schlessinger J. (2000) Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell*, 101: 413-424.
- Powers C., McLeskey S. y Wellstein A. (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endo Ca*, 7: 165-197.
- Prudovsky I., McMahon G., Hu X. y Maciag T. (2008) Activation of the MAP kinase pathway by FGF-1 correlates with cell proliferation induction while activation of the Scr pathway correlates with migration. *J Cell Biol*, 141:1647-1658.
- Raghu G., DePaso W. y Hammar S. (1991) Azathioprine combined with prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective double-blind randomized, placebo controlled clinical trial. *Am Rev Respir Dis*, 6: 144-291.
- Ramos C., Becerril C., Cisneros J. y Montaña M. (2004) El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 17(3): 215-231.
- Ramos C., Montaña M., García J., Ruiz V., Uhal D., Selamn M. y Pardo A. (2001) Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24: 591-598.
- Roux P. y Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK- activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Micro Mol Bio Rev*, 68: 320-344.
- Schlessinger J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103: 211-225.

- Seger R. y Krebs E. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 9(9): 726-735.
- Selman M., King T. y Pardo A. (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevaling and evolving hypothesis about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*, 134: 136-151.
- Selman M., Navarro C. y Gaxiola M. (2005) Fibrosis pulmonar Idiopática: en busca de un tratamiento eficaz. *Arch Bronconeumol*, 41 (Supl5): 15-20.
- Selman M. y Pardo A. (1996) Pathogenic mechanism in the development of diffuse pulmonary fibrosis. *Braz J Med Biol Res*, 29: 1117-1126.
- Senties M., Galvez F., Meza E. y Armendariz J. (2005) Fibrosis Hepática. El papel de las metaloproteinasas y del TGF- β . *Gac Méd Méx*, 141(4): 315-322.
- Sheppard M. y Harrison N. (1992) Lung injury, inflammatory mediators and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. *Thorax*, 47: 1064-1074.
- Solera R., Manzur J., Mora T, y Flores D. (2007) Papel de las metaloproteinasas de la matriz en la degradación: Una revisión literaria. *Rev Cient*, 56:20-25.
- Visse R. y Nagase H. (2003) Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res*, 92: 827-836.
- Xaubet A., Molina M. y Sanchez M. (2007) Enfermedades pulmonares intersticiales difusas. *Arch Bronconeumol*, 43 (supl 2): 24-30.
- Willenbrock F. y Murphy G. (1994) Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med*, 150: 165-170.
- Woessner J. (2001) That impish TIMP: the tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *J Clin Invest*, 108(106): 799-800.
- Wurtz S., Schroll A., Sorensen M., Laddeman U., Christensen J., Mouridsen H. y Brønner N. (2005) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 215-227.
- Wu C., y Huang J. (2007) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *J Biol Chem*, 282: 3571-3583.