

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA  
MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN LA  
MEMBRANA BASAL PULMONAR DE RATAS  
DEFICIENTES EN VITAMINA A Y SU REVERSIBILIDAD  
POR ÁCIDO RETINOICO

GUILLERMO ESTEBAN PRETEL

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 8 de maig de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. José Becerra Ratia
- Dr. Juan Sastre Belloch
- Dr. Erwin Knecht Roberto
- Dr. Jaime Renan Piqueras
- Dr. Julio Coloma Contreras

Va ser dirigida per:

Dr. Joaquín Timoneda Timoneda

Dra. M<sup>a</sup> del Pilar Marín Muela

©Copyright: Servei de Publicacions  
Guillermo Esteban Pretel

---

Dipòsit legal: V-832-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7580-8

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



**CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN LA MEMBRANA  
BASAL PULMONAR DE RATAS DEFICIENTES EN VITAMINA A Y  
SU REVERSIBILIDAD POR ÁCIDO RETINOICO**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Guillermo Esteban Pretel

Valencia, 2009

**D. JOAQUÍN TIMONEDA TIMONEDA**, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

**Dña. M<sup>a</sup> del PILAR MARÍN MUELA**, Investigadora del servicio de Biología y Patología Celular del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

**Certifican:**

que **D. GUILLERMO ESTEBAN PRETEL**, Licenciado en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de investigación, titulado **“CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN LA MEMBRANA BASAL PULMONAR DE RATAS DEFICIENTES EN VITAMINA A Y SU REVERSIBILIDAD POR ÁCIDO RETINOICO”**, el cual posee la suficiente calidad científica para ser presentado en la obtención del grado de Doctor en Farmacia.

Y, para que conste a todos los efectos firman la presente certificación en Valencia, a 3 de Marzo de 2009.

Fdo. Dr. Joaquín Timoneda Timoneda

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> del Pilar Marín Muela

El presente trabajo ha sido realizado con subvención de la Conselleria de Cultura, Educació i Esport –Generalitat Valenciana (GV-D-VS-20-164-96)– al proyecto “Estudio de la estructura y composición de la membrana basal de pulmón en la deficiencia de vitamina A”, y del Instituto de Salud Carlos III Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) –Ministerio de Sanidad y Consumo (PI05/2534)– al proyecto “Mecanismos moleculares implicados en el daño tisular originado por deficiencia crónica de vitamina A. Participación de la matriz extracelular”.

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado durante el periodo de disfrute de una Beca F.P.I de la Conselleria de Cultura, Educació i Esport de la Generalitat Valenciana.

A Gurb.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido de una forma u otra a la realización de esta Tesis.

He de agradecer al Dr. Joaquín Timoneda y a la Dra. M<sup>a</sup> del Pilar Marín, directores de este trabajo y responsables de mi formación científica, su dedicación, conocimientos e ilusión en la dirección de esta tesis.

Quiero mostrar mi reconocimiento a los profesores y miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia por su agradable acogida y apoyo, y especialmente a la Dra. Teresa Barber por su inestimable ayuda y colaboración en esta investigación.

De igual forma quiero agradecer al Dr. Jaime Renau su valiosa ayuda y contribución al desarrollo de este trabajo, así como a los miembros de la sección de Biología y Patología Celular del Centro de Investigación del Hospital La Fe, por hacerme sentir como en casa.

Mi gratitud es especialmente cálida para la Dra. M<sup>a</sup> Pilar López y el Dr. Julio Coloma, por su amistad, ánimos y buenos consejos. Por dejarme disfrutar de su compañía y compartir conmigo innumerables historias, que tanto me han enseñado.

Deseo expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. María Morante, mi compañera de laboratorio, una amiga para el día a día. Y a Joan Martí, por su gran amistad y acogerme en su despacho durante todo este tiempo.

Al Dr. Erwin Knecht y a los miembros de su laboratorio en el Instituto de Investigaciones Citológicas, especialmente a la Dra. Graciela Fuertes, gracias por todo lo que me enseñaron y su amistad.

No olvidar a todos aquellos que han compartido horas de laboratorio conmigo: Chelo, Inma, Elena, Luisa, Amparo y en especial a Dolores, por su compañía, sus ánimos, su ayuda, las risas y todas las charlas.

Además, muchas gracias a Alex y a María por ayudarme, codo con codo, a crear y hacer que respirase esta tesis.

A Ana quisiera mostrarle cuanto le agradezco el haber compartido conmigo esta experiencia, y haberme aguantado y apoyado más que nadie.

No quisiera terminar sin expresar mi más profunda gratitud a mi familia, a mis padres y a mis hermanos por su dedicación, ánimos y el gran ejemplo que han supuesto para mi.

## ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Matriz Extracelular .....	2
2. Membrana Basal. ....	5
2.1. Estructura y composición .....	6
2.1.1. Colágenos .....	9
2.1.2. Lamininas .....	14
2.1.3. Proteoglicanos .....	18
2.1.4. Entactinas/Nidogenos. ....	19
2.1.5. Osteonectina y Fibulina .....	20
2.1.6. Metaloproteasas de Matriz e Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas .....	21
2.2. Ensamblaje de la Membrana Basal. ....	23
2.3. Funciones de la MB. ....	25
3. Fisiología Pulmonar. ....	28
3.1. Generalidades. ....	28
3.2. Alveolo pulmonar. Membrana Basal alveolocapilar .....	30
3.3. Patología pulmonar. Alteraciones relacionadas con la membrana basal .....	34
4. Vitamina A .....	40
4.1. Retinoides y carotenoides .....	40
4.1.1. Absorción, transporte y metabolismo .....	42
4.2. Propiedades y funciones de la vitamina A .....	44
4.2.1. Funciones mediadas por receptores de retinoides. ....	44
4.2.2. Función antioxidante-prooxidante de la vitamina A. ....	46
4.3. Vitamina A, desarrollo alveolar y función pulmonar. ....	48
4.4. Deficiencia de vitamina A .....	50
4.4.1. Etiología. ....	50
4.4.2. Patologías relacionadas con la deficiencia de vitamina A .....	52
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	54
1. Hipótesis .....	55
2. Objetivos .....	56
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	57

<b>MATERIALES</b> .....	<b>58</b>
1. Productos y reactivos .....	58
2. Aparatos e instrumental .....	58
2.1. Microscopio electrónico .....	58
2.2. Ultramicrotomos .....	59
2.3. Microscopio óptico .....	59
2.4. Aparatos ópticos .....	59
2.5. Aparatos de electroforesis y transferencia .....	59
2.6. Centrífugas .....	60
2.7. Incubadores .....	60
2.8. Sonicator .....	60
2.9. Analizador de RNA y Termocicladores .....	60
2.10. HPLC .....	60
2.11. Otros .....	61
3. Animales de experimentación .....	61
4. Dietas AIN-93G .....	62
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>65</b>
1. Tratamiento dietético de los animales .....	65
2. Obtención de muestras biológicas .....	66
3. Medida de Retinoides .....	67
3.1. Extracción de retinoides .....	67
3.2. Condiciones del método de HPLC .....	68
4. Determinación de factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ) e interleuquina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	68
5. Determinación de actividad mieloperoxidasa .....	69
6. Determinación del factor de crecimiento $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ) en pulmón .....	70
7. Valoración del estrés oxidativo. Niveles de malondialdehído .....	70
8. Preparación de membrana basal de pulmón .....	71
9. Digestión con colagenasa bacteriana .....	72
10. Determinación de Hidroxiprolina .....	72
11. Técnicas electroforéticas .....	73
11.1. Electroforesis .....	73
11.2. Western-Blot .....	74
12. Métodos de detección de proteínas .....	75
12.1. Detección de proteínas totales .....	75
12.1.1. Tinción con azul de coomassie .....	75
12.1.2. Tinción de plata .....	75
12.1.3. Secado de geles .....	76
12.2. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas .....	77
13. Determinación de actividad colagenasa .....	79
14. Análisis de mRNA mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real .....	80

14.1. Aislamiento de RNA total . . . . .	80
14.2. Análisis cualitativo del RNA . . . . .	81
14.3. Cuantificación de los niveles de mRNA por RT-PCR cuantitativo en tiempo real . . . . .	82
14.3.1. Transcripción reversa (RT) . . . . .	82
14.3.2. Preparación de estándares . . . . .	83
14.3.3. PCR cuantitativo en tiempo real . . . . .	85
15. Procesamiento de las muestras para microscopía electrónica . . . . .	87
15.1. Muestras destinadas a análisis morfológicos . . . . .	87
15.1.1. Postfijación y tinción . . . . .	87
15.1.2. Deshidratación . . . . .	88
15.1.3. Infiltración . . . . .	88
15.1.4. Encapsulado y polimerización . . . . .	89
15.2. Muestras destinadas a análisis inmunocitoquímico . . . . .	89
15.2.1. Postfijación. . . . .	89
15.2.2. Deshidratación . . . . .	90
15.2.3. Infiltración . . . . .	90
15.2.4. Encapsulado y polimerización . . . . .	90
16. Obtención y tinción de secciones semifinas y ultrafinas . . . . .	91
16.1. Obtención de secciones semifinas . . . . .	91
16.2. Tallado . . . . .	91
16.3. Obtención de secciones ultrafinas . . . . .	91
16.4. Tinción de cortes ultrafinos con acetato de uranilo y citrato de plomo . . . . .	91
16.4.1. Preparación de acetato de uranilo . . . . .	92
16.4.2. Preparación de citrato de plomo. . . . .	92
16.4.3. Tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo . . . . .	92
17. Estudios de ultraestructura . . . . .	93
18. Inmunocitoquímica . . . . .	93
19. Procedimientos generales . . . . .	94
<b>RESULTADOS</b> . . . . .	<b>96</b>
1. Modelo experimental de deficiencia de vitamina A crónica . . . . .	97
1.1. Estudio del peso corporal, pulmonar, renal y cardiaco en ratas control y deficientes en vitamina A. . . . .	97
1.2. Valoración de los retinoides mayoritarios en plasma y en pulmón . . . . .	98
2. Efecto de la deficiencia de vitamina A sobre la composición de la matriz extracelular pulmonar . . . . .	100
2.1. Estudio del contenido en colágenos de la matriz extracelular pulmonar . . . . .	100
3. Efecto de la deficiencia de vitamina A en la ultraestructura de la membrana basal alveolar . . . . .	102
4. Efecto de la deficiencia de vitamina A en la composición de la membrana basal alveolar . . . . .	106

4.1.	Estudio del contenido en colágeno IV . . . . .	107
4.2.	Estudio de la composición de la molécula de colágeno IV. . . . .	108
4.3.	Estudio del contenido de cadenas de laminina . . . . .	110
4.4.	Estudio de las deposiciones de colágeno en la membrana basal alveolar. . . . .	112
5.	Efecto de la deficiencia de vitamina A en el colágeno I pulmonar . . . . .	113
6.	Efecto de la deficiencia de vitamina A en la expresión génica de distintos componentes de la membrana basal y matriz extracelular pulmonar . . . . .	115
6.1.	Análisis del contenido de mRNA para las cadenas $\alpha$ del colágeno IV. . . . .	116
6.2.	Análisis del contenido de mRNA para las cadenas de laminina . . . . .	117
6.3.	Análisis del contenido de mRNA de las cadenas $\alpha$ del colágeno I y del colágeno III . . . . .	119
7.	Efecto de la deficiencia de vitamina A en las metaloproteasas de matriz y sus inhibidores. . . . .	120
7.1.	Estudio de la actividad proteolítica de las metaloproteasas de matriz mediante zimografía . . . . .	121
7.2.	Estudio mediante Western Blot de Inhibidores tisulares de metaloproteasas. . . . .	122
8.	Determinación de citoquinas inflamatorias y profibróticas en la deficiencia de vitamina A . . . . .	123
8.1.	Citoquinas inflamatorias y profibróticas . . . . .	124
8.1.1.	Valoración de las interleuquinas $1\alpha$ y $1\beta$ , y el factor de necrosis tumoral. . . . .	124
8.1.2.	Valoración del factor transformador de crecimiento $\beta_1$ . . . . .	125
8.2.	Mieloperoxidasa . . . . .	126
9.	Valoración del estrés oxidativo pulmonar en la deficiencia de vitamina A. . . . .	127
	<b>DISCUSIÓN</b> . . . . .	129
1.	Discusión. . . . .	130
	<b>CONCLUSIONES</b> . . . . .	155
1.	Conclusiones . . . . .	156
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> . . . . .	157
	<b>PUBLICACIONES</b> . . . . .	191

## ABREVIATURAS

<b>7S:</b> extremo N-terminal del colágeno IV	<b>MDA:</b> malondialdehído
<b>ADH:</b> alcohol deshidrogenasa	<b>ME:</b> microscopía electrónica
<b>ALDH:</b> aldehído deshidrogenasa	<b>MEC:</b> matriz extracelular
<b>AIN:</b> american institute of nutrition	<b>MMP:</b> metaloproteasa de matriz
<b>AP:</b> fosfatasa alcalina	<b>MPO:</b> mieloperoxidasa
<b>AP-1:</b> proteína activadora 1	<b>NADPH:</b> nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato (forma reducida)
<b>B2MG:</b> $\beta$ -2microglobulina	<b>Nd:</b> nidogeno
<b>BCDO:</b> $\beta$ -caroteno dioxigenasa	<b>NC:</b> dominio no colagenoso
<b>BHT:</b> butilhidroxitolueno	<b>OMS:</b> organización mundial de la salud
<b>BOS:</b> bronquiolitis obliterans	<b>pb:</b> pares de bases
<b>BSA:</b> albúmina de suero bovino	<b>PBS:</b> tampón fosfato salino
<b>CRABP:</b> proteínas celulares de unión a ácido retinoico	<b>PG:</b> proteoglicanos
<b>CRBP:</b> proteínas celulares de unión a retinol	<b>P/v:</b> relación peso/volumen
<b>DDR:</b> receptor con dominio discoidina	<b>REH:</b> hidrolasa ácida lisosomal de ésteres de retinol
<b>DEPC:</b> agua ultrapura con dietilpirocarbonato al 0,1%	<b>RALDH:</b> retinal deshidrogenasa citosólica
<b>DG:</b> distroglicano	<b>RAR:</b> receptores de ácido retinoico
<b>DM:</b> diabetes mellitus	<b>RARE:</b> elemento de DNA reconocido por RAR
<b>DNA:</b> ácido desoxiribonucleico	<b>RBP:</b> proteínas de unión a retinol
<b>dNTP:</b> desoxinucleótido trifosfato	<b>RNA:</b> ácido ribonucleico
<b>EDTA:</b> ácido etilendiamino tetracético	<b>RT-PCR:</b> transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
<b>EGF:</b> factor de crecimiento epidérmico	<b>RR:</b> grupo experimental recuperado con ácido retinoico
<b>EHS:</b> Engelbreth-Holm-Swarm	<b>RXR:</b> receptores de retinoides X
<b>EMT:</b> transición epitelio-endotelio mesénquima	<b>RXRE:</b> elemento de DNA reconocido por RXR
<b>EPOC:</b> enfermedad pulmonar obstructiva crónica	<b>SD:</b> desviación estándar
<b>FCS:</b> suero fetal de becerro	<b>SDS:</b> dodecil sulfato sódico
<b>Fib:</b> fibulina	<b>SDS-PAGE:</b> electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>FPI:</b> fibrosis pulmonar idiopática	<b>SEM:</b> error estándar de la media
<b>GAG:</b> glicosaminoglicanos	<b>TAE:</b> tampón tris con ácido acético y EDTA
<b>GF:</b> factor de crecimiento	<b>TBA:</b> ácido tiobarbitúrico
<b>HIV:</b> virus de inmunodeficiencia humana	<b>TBS:</b> tampón tris salino
<b>HPLC:</b> cromatografía líquida de alta resolución	<b>TBST:</b> tampón Tris salino con 0.1 % de Tween 20
<b>HRP:</b> peroxidasa de remolacha	<b>TCA:</b> ácido tricloroacético
<b>IgG:</b> inmunoglobulina G	<b>TGF<math>\beta</math>:</b> factor transformador de crecimiento $\beta$
<b>IL:</b> interleuquina	<b>TIMP:</b> inhibidor tisular de metaloproteasas
<b>KDa:</b> kilodaltons	<b>TNF<math>\alpha</math>:</b> factor de necrosis tumoral
<b>LRAT:</b> lecitina-retinol aciltransferasa	<b>Tris:</b> 2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol
<b>LE:</b> dominio de la molécula de laminina similar a EGF	<b>TTR:</b> transtirretina
<b>LG:</b> dominio globular de la molécula de laminina C-terminal	<b>V/v:</b> relación volumen/volumen
<b>LN:</b> dominio de la molécula de laminina N-terminal	<b>VAD:</b> deficiente en vitamina A
<b>MB:</b> membrana basal	<b>VADD:</b> desordenes asociados a deficiencia de vitamina A
<b>MBA:</b> membrana basal alveolar	<b>VEGF:</b> factor de crecimiento vascular endotelial
<b>MBG:</b> membrana basal glomerular	

## **INTRODUCCIÓN**

## 1. Matriz Extracelular

Las células que componen los tejidos de los organismos pluricelulares están inmersas y en íntimo contacto con una intrincada trama de macromoléculas extracelulares que constituyen la matriz extracelular (MEC). Esta matriz está constituida por distintos polisacáridos y proteínas que son secretados localmente por células que se encuentran distribuidas por la matriz (principalmente fibroblastos), y se ensamblan formando una red organizada en el espacio extracelular (Alberts *et al.*, 2002). Dependiendo del tejido, la red varía considerablemente en composición y organización, adaptándose a los distintos requerimientos de cada órgano. Así por ejemplo, en los cartílagos la constituyen proteoglicanos, hialuronano y fibras de colágeno y en las fibras musculares laminina, colágeno tipo IV, entactina, fibronectina y proteoglicanos (Comper, 1996).

Tradicionalmente se ha considerado a la MEC como una sustancia estructuralmente estable que da soporte a células y tejidos. Sin embargo, numerosos descubrimientos han cambiado la perspectiva y en la actualidad se considera que la MEC es una estructura con un orden complejo, compuesta por diferentes macromoléculas, cuya integridad estructural y funcional influye de manera notable en el mantenimiento de la arquitectura de los tejidos, en su desarrollo y en su función específica (Birk y Trelstad, 1984; Labat-Robert *et al.*, 1990; Hay, 1991). Así mismo, alteraciones estructurales en los distintos componentes de la MEC o anomalías en su síntesis y catabolismo han sido relacionadas con enfermedades tanto hereditarias como adquiridas (Martínez-Hernández y Amenta 1983; Hay, 1991; Rohrbach *et al.*, 1993; Royce *et al.*, 1993).

Principalmente dos tipos de macromoléculas extracelulares componen la MEC; el primer grupo serían cadenas de polisacáridos, de la clase llamada glicosaminoglicanos (GAGs), que normalmente se encuentran unidos covalentemente a proteínas formando los proteoglicanos, y el segundo grupo estaría constituido por proteínas fibrilares (colágeno y elastina) y proteínas estructurales o adhesivas (fibronectina y laminina) (Alberts *et al.*, 2002).

Las fibras de colágeno constituyen el componente principal de la MEC, y tienen una estructura de triple hélice en forma de cuerda compuesta por tres cadenas  $\alpha$ , que confiere resistencia a la MEC (Montes *et al.*, 1996). A pesar de su gran diversidad en

los tejidos conectivos, los colágenos I, II, III, V (fibrilares) y los colágenos IV, VI, VII, VIII (no fibrilares o amorfos) representan los principales colágenos de la MEC, aunque los colágenos X y XVII también están presentes, pero cuantitativamente son menos importantes que los otros.

En función de la organización supramolecular que presentan en la MEC y del análisis de los exones de los genes que codifican estas proteínas, los distintos tipos de colágenos se agruparon en cinco familias (Vuorio y de Crombrughe, 1990):

1. Colágenos fibrilares. En este grupo se incluyen los tipos I, II, III, V y XI. En todos estos tipos las moléculas se asocian formando fibrillas estriadas en los distintos tejidos.

2. Colágenos “FACIT” (colágenos asociados a fibras, con interrupciones en la estructura triple helicoidal). Aparecen asociados a los colágenos fibrilares, permitiendo la interacción de estos con otras macromoléculas de la MEC. Esta familia incluye los tipos IX, XII, y XIV.

3. Colágenos de cadena corta. Comparado con los colágenos formadores de fibrillas, las cadenas de los colágenos pertenecientes a esta familia tienen un menor tamaño, y aunque se encuentran similitudes en sus dominios estructurales, la ubicación espacial y temporal es diferente. Pertenecen a esta familia los tipos VI, VII, VIII y X.

4. Colágenos de la membrana basal (MB). En esta estructura el principal componente es el colágeno IV, que constituye una red tridimensional con la que interaccionan otros componentes de la MB. Del colágeno IV se hablará más extensamente en el apartado de la MB.

5. Otros colágenos. Se incluyen el resto de tipos de colágenos que forman parte de estructuras especializadas en diferentes tejidos.

Los colágenos más importantes en la matriz intersticial pulmonar son el colágeno tipo I, III y V. El colágeno tipo I es el colágeno más abundante de todos y se encuentra ampliamente distribuido en todos los órganos. La triple hélice del colágeno tipo I está formada por un heterotrímero, con dos cadenas idénticas  $\alpha 1(I)$  y una  $\alpha 2(I)$ , de 1.5 nm de diámetro y 300 nm de largo. Estos protómeros se ensamblan en fibrillas estriadas

que a su vez se agrupan para formar fibras de colágeno mayores. Es sintetizado por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos y su función principal es la de conferir resistencia mecánica. El colágeno tipo III es un homotrímero formado por tres cadenas  $\alpha 1(\text{III})$ , que se distribuye por los tejidos que contienen colágeno I, salvo en el hueso. Es un componente importante de las fibras reticulares del tejido intersticial de los pulmones, hígado, dermis, bazo y vasos sanguíneos. Es sintetizado por las células del músculo liso, fibroblastos y glía, y su función es la de sostén de los órganos expansibles. El colágeno V forma heterotímeros de tres cadenas  $\alpha$  diferentes ( $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ ). Es típico encontrar este colágeno en combinación con los colágenos tipo I y tipo III para formar heterofibras, que aparecen en huesos, estroma corneal y en la matriz intersticial de músculos, hígado, pulmones y placenta (Gelse *et al.*, 2003).

La MEC tiene una gran variedad de funciones. Además de las propiedades estructurales, como soporte estructural, compartimentación de tejidos al separar el epitelio o el endotelio del intersticio, o servir de barrera física para el flujo de moléculas y células, la MEC también funciona como un modulador dinámico de diversos procesos biológicos. Estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, muestran que la MEC influye sobre la biología celular a distintos niveles incluyendo la adhesión y diseminación celular, cambios en la organización y diferenciación del citoesqueleto, estimulación de la proliferación y migración celular, inducción de la polaridad y expresión génica, y alteración de la actividad metastática. Además, las interacciones célula-MEC mediadas por receptores específicos de la superficie celular para los componentes de la MEC, principalmente las integrinas, juegan un papel importante en el desarrollo embrionario y organogénesis, en cicatrización de heridas, en metástasis, y en angiogénesis (Dunsmore *et al.*, 1996; Starcher, 2000).

## 2. Membrana Basal

La membrana basal es una forma altamente especializada de MEC, de estructura amorfa y densa, en forma de lámina con un grosor aproximado de 50-100 nm que forma una barrera entre las células parenquimáticas y el tejido conectivo adyacente. Interviene en muchas e importantes funciones biológicas, y actúa como mediadora en la diferenciación, adhesión, migración y proliferación celular. Entre las funciones en las que interviene se incluyen desarrollo embrionario, mantenimiento y remodelación de la arquitectura tisular y filtración de la sangre y el aire entre otros. También actúa a modo de barrera anatómica protegiendo tejidos y órganos frente a factores exógenos y estrés mecánico (Sado *et al.*, 1998).

La MB fue inicialmente identificada mediante microscopía electrónica y se mostraba similar a la MEC, material que se encuentra distribuido por todo el intersticio, pero difería en densidad y aparecía siempre asociada a células (Vracko, 1974; Ruben y Yurchenco, 1994; Prockop y Kivirikko, 1995). El aspecto que ofrecía al observarla al microscopio electrónico, a diferencia de la MEC, era el de una delgada estructura en la que podían diferenciarse dos capas morfológicamente distintas, denominadas lámina lúcida o rara y lámina densa, según tuvieran baja o alta densidad a los electrones (Vracko y Strandness, 1967; Vracko y Benditt, 1970; Vracko, 1972; Vracko y Benditt, 1972; Vracko, 1974; Ruben y Yurchenco, 1994). Estas observaciones ultraestructurales dieron la primera pista sobre la existencia de una forma especializada de MEC (Timpl, 1986; Timpl, 1989) y aunque en un principio se describió por éstas características, actualmente se define más por su composición molecular y por su estrecha asociación con la superficie celular (Timpl y Brown, 1996; Erickson y Couchman, 2000; Kalluri, 2003).

Las MBs se localizan en casi todos los órganos del cuerpo, donde aparecen compartimentando los diferentes tejidos, proporcionando un soporte estructural y regulando el comportamiento celular (Schittny y Yurchenco, 1989; Paulsson, 1992). Generalmente se encuentran en la interfase existente entre las células de tejidos organizados y el tejido conectivo adyacente, aunque hay excepciones como por ejemplo las MBs que forman parte del alveolo pulmonar y del glomérulo renal, que se disponen entre dos capas celulares, donde actúan como filtro altamente selectivo, regulando la

salida de pequeñas moléculas desde la sangre al exterior en el riñón o su entrada desde el aire al interior del organismo en el pulmón (Hudson *et al.*, 1993).

También encontramos a las MBs rodeando a las fibras musculares esqueléticas y lisas, a los adipocitos en el tejido graso, a los capilares del cerebro y a las células del sistema nervioso central (Timpl y Brown, 1996).

## 2.1. Estructura y composición

Las MBs están constituidas por un material altamente entrecruzado e insoluble, que está compuesto por diferentes glicoproteínas. Hoy en día se conocen alrededor de 50 proteínas que pueden formar parte de las MBs. El colágeno (especialmente el tipo IV) es el principal componente y representa el 50% o más, según el órgano, de todas las proteínas de la MB. Aunque al observarlas al microscopio electrónico las MBs parecen similares, y sus principales componentes son comunes, su estructura y composición varía de un tejido a otro e incluso dentro del mismo tejido, según el estadio del desarrollo en el que se encuentra, así como de otros procesos fisiopatológicos como la reparación tisular. Es posible que esta diversidad bioquímica confiera especificidad a los tejidos, de modo que el conocimiento de las potenciales diferencias en la composición y estructura de las MBs de diferentes órganos, podría quizá revelarnos cómo el microentorno que rodea a las células es capaz de afectar a la función de los diferentes tejidos (Kalluri, 2003).

La primera proteína constituyente de la MB en analizarse bioquímicamente fue el colágeno IV, aunque pronto fue seguida por el descubrimiento de una glicoproteína, la laminina, que es el principal componente no colagenoso de la MB (Chung *et al.*, 1979; Timpl *et al.*, 1979). A ellas hay que añadir heparán sulfato proteoglicano o perlecano y entactina/nidogeno (Timpl y Brown, 1996). Además encontramos otras moléculas minoritarias, como agrina, osteonectina y fibulina, que han sido localizadas en algunos tipos especiales de MB.

A medida que se han ido caracterizando más componentes de la MB, la complejidad de su estructura se ha descubierto mayor. Estudios sobre la composición y biología de la MB han revelado nuevos colágenos como el XV, XVIII y XIX y distintas fibulinas

(Timpl y Brown, 1996). También ha sido posible la descripción de nuevos complejos entactina/nidogeno, la caracterización de agrina y heparan sulfato proteoglicanos, y la expansión de la familia de lamininas (Erickson y Couchman, 2000).

Las principales proteínas que forman la MB, así como los receptores que interaccionan con ella, están conservados en animales tan separados filogenéticamente como *Caenorhabditis*, *Drosophila* y el hombre. A pesar de todo, en vertebrados existen diferentes isoformas de estas proteínas, que aun compartiendo dominios homólogos pueden diferir en sus secuencias de aminoácido en un 30-50% (Hutter *et al.*, 2000; Hynes y Zhao, 2000).

En la tabla 1 se muestra un resumen de las principales proteínas constituyentes de la MB, de su estructura oligomérica, isoformas y receptores celulares (Sasaki *et al.*, 2004).

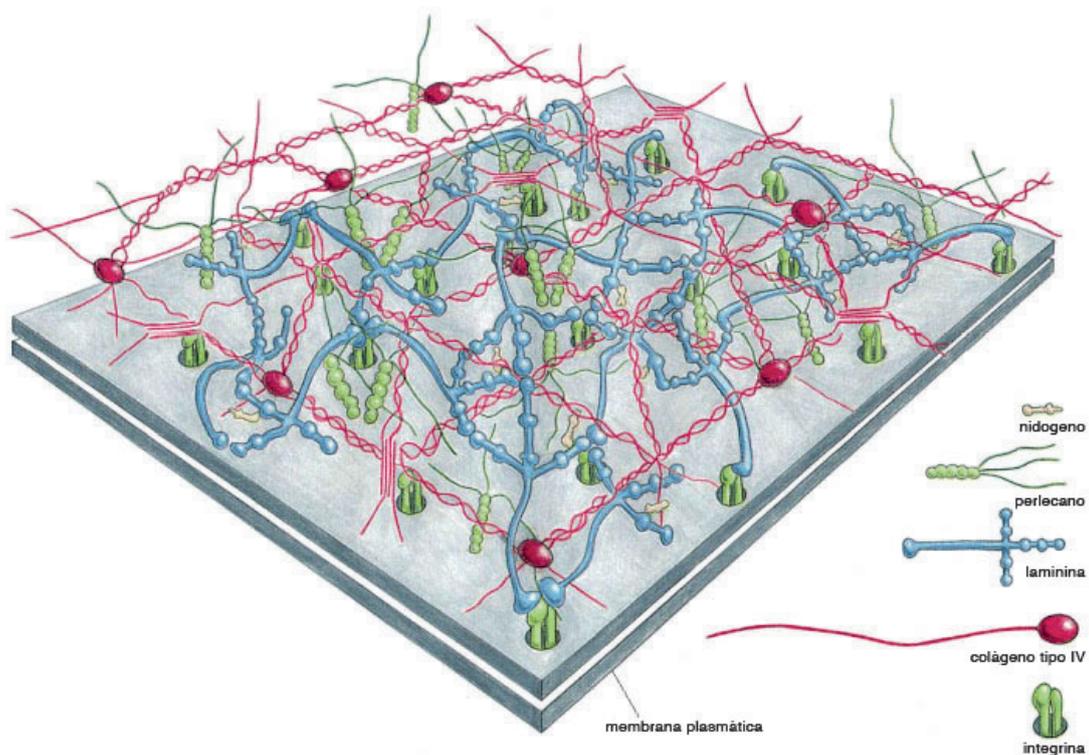
Proteína (familia)	Estructura oligomérica, isoformas	Receptores Celulares
Colágeno IV	Al menos 3 heterotrímeros formados por 6 cadenas $\alpha$ homólogas	Integrinas ( $\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ )
Laminina	Al menos 15 heterotrímeros formados a partir de 11 cadenas, $5\alpha$ , $3\beta$ y $3\gamma$ ; más diversidad por procesamientos proteolíticos y splicing alternativo	Integrinas ( $\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha 3\beta 1$ , $\alpha 6\beta 1$ , $\alpha 6\beta 4$ , $\alpha 7\beta 1$ ); distroglicano; heparan sulfato proteoglicanos, sulfatidos; HNK-1( $\alpha 1$ ); Luterano ( $\alpha 5$ )
Entactina/Nidogeno	Cadena simple; 2 isoformas	Integrinas ( $\alpha 3\beta 1$ , $\alpha V\beta 3$ )
Perlecano	Cadena simple; proteoglicano	Distroglicano
Agrina	Cadena simple; proteoglicano; actividades biológicas reguladas por splicing alternativo	Distroglicano; MuSK/receptor de agrina
Colagéno XV	Homotrímero; proteoglicano	
Colagéno XVIII	Homotrímero; proteoglicano; splicing alternativo	Heparan sulfato proteoglicanos
Fibulina	5 isoformas; splicing alternativo (Fibulina-1); monómeros y dímeros por puente disulfuro	Integrinas (fibulina-2: $\alpha 11\beta 3$ ; fibulina-5: $\alpha V\beta 3$ , $\alpha V\beta 5$ , $\alpha 9\beta 1$ )
Osteonectina/SPARC/BM-40	Cadena simple; varios homólogos poco caracterizados	

**Tabla 1.** Proteínas de la membrana basal de mamífero (Sasaki *et al.*, 2004).

El elevado número de interacciones entre las moléculas de la MB contribuyen a su ensamblaje, que dará lugar a la superestructura en forma de red que las caracteriza. También les proporciona estabilidad mecánica frente a las diferentes tensiones a las que

se ven sometidas en las uniones dermico-epidérmicas o a las considerables presiones aéreas en los alveolos pulmonares e hidrostáticas en los glomerulos.

Actualmente el modelo general de MB que se postula, propone la existencia de dos redes poliméricas, formadas por colágeno tipo IV y laminina, interconectadas vía entactina/nidogen (Aumailley *et al.*, 1989; Yurchenco *et al.*, 1992; Timpl y Brown, 1996). Estudios *in vitro*, indican que el perlecano interactúa con el colágeno IV y la entactina a través de su proteína núcleo, y de sus cadenas de GAGs con la laminina (Battaglia *et al.*, 1992; Reinhardt *et al.*, 1993). Se cree que otros componentes minoritarios, como la osteonectina y las fibulinas, interactúan con uno o más de los componentes principales de forma tejido-específicas (Aumailley, 1995).



**Figura 1.** Modelo de la estructura molecular de una MB. La MB está formada por interacciones específicas entre colágeno IV, laminina, entactina/nidogeno, perlecano e integrinas de la superficie celular (Alberts *et al.*, 2002).

Otros estudios indican que laminina, perlecano, entactina/nidogen, fibulinas y colágeno XVIII, pueden también interactuar entre ellos favoreciendo la cohesión de la estructura (Erickson y Couchman, 2000).

### **2.1.1. Colágenos**

Los colágenos comprenden una gran superfamilia de proteínas extracelulares que juegan un papel importante en la integridad estructural de todos los tejidos. Al menos 28 tipos de colágeno distintos, constituidos por 43 cadenas polipeptídicas diferentes, han sido identificados en vertebrados. Las propiedades funcionales de los colágenos dependen de la presencia de un dominio triple helicoidal y de dominios globulares (Burgeson, 1988; Myllyharju y Kivirikko, 2004; Khoshnoodi *et al.*, 2006a).

El rasgo principal de todos los colágenos es una estructura en forma de triple hélice constituida por tres cadenas polipeptídicas (cadenas  $\alpha$ , hélices levógiras). Se trata de una triple hélice destrógira regular, de aproximadamente 300 nm de largo y 1.5 nm de diámetro (Burgeson, 1988; Alberts *et al.*, 2002), que queda estabilizada por puentes de hidrógeno intercatenarios. Las cadenas  $\alpha$  del colágeno son extremadamente ricas en glicina y prolina, aminoácidos que tienen una gran importancia en la formación y estabilización de la triple hélice.

La glicina aparece formando parte de secuencias repetitivas del triplete Gly-X-Y, en las que X e Y son frecuentemente restos de prolina e hidroxiprolina respectivamente (Alberts *et al.*, 2002). Las pequeñas interrupciones de esta secuencia, encontradas en varios colágenos, parecen introducir regiones de gran flexibilidad en la triple hélice con una elevada susceptibilidad a proteasas. Dichas regiones son dominios altamente conservados en cada tipo de colágeno entre las distintas especies (Hofmann *et al.*, 1984).

*Colágeno tipo IV.* Como ya se ha mencionado con anterioridad, el colágeno IV es el constituyente más abundante de la MB. Fue aislado en 1966 por Kefalides a partir de MB de glomérulo renal. Debido a su compleja organización supramolecular forma intrincadas redes tridimensionales a las que se asocian el resto de macromoléculas de la MB mediante diferentes tipos de interacciones (Timpl y Brown, 1996). Normalmente

solo se localiza en la MB, sin embargo aparece asociado a fibrosis durante procesos patológicos, y se acumula en el intersticio de tumores (Kalluri y Neilson, 2003).

El colágeno tipo IV se define como una familia de proteínas que agrupa diferentes isoformas de moléculas triplehelicoidales compuestas cada una de ellas por tres cadenas  $\alpha$  (Hudson *et al.*, 1993). Existen seis cadenas  $\alpha$  genéticamente distintas ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ), llamadas monómeros, de las que derivan todos los tipos de colágeno IV de los mamíferos. Todas ellas presentan grandes homologías en su estructura primaria (50-70%) y en su organización genómica, lo que permite agruparlas en dos clases, la primera agrupa a las cadenas con mayor similitud con  $\alpha 1$ (IV), que son  $\alpha 3$ (IV) y  $\alpha 5$ (IV) y la segunda a las que tienen mayor parecido con  $\alpha 2$ (IV), que son  $\alpha 4$ (IV) y  $\alpha 6$ (IV) (Hudson *et al.*, 1993; Kalluri *et al.*, 2003).

Cada cadena  $\alpha$  se caracteriza por un largo dominio colagenoso de aproximadamente 1400 residuos, en los que se repite el triplete Gly-X-Y, que se ve interrumpido por 22 secuencias cortas no colagenosas (NC), y dos dominios también de características no colagenosas flanqueándolo, un dominio N-terminal de aproximadamente 15 residuos (NC2) y otro con unos 230 residuos que constituye el extremo C-terminal de la cadena o dominio NC1 (Hudson *et al.* 1993). También aparece un segmento colagenoso menor (7S) rico en cisteínas, que constituye el extremo N-terminal de la cadena y que está separado del segmento colagenoso principal por el dominio globular NC2.

Los genes que codifican las distintas cadenas  $\alpha$ (IV) en mamíferos, se sitúan por parejas, cabeza con cabeza, en tres cromosomas distintos. Los genes COL4A1 y COL4A2, que codifican las cadenas  $\alpha 1$ (IV) y  $\alpha 2$ (IV), se encuentran en el cromosoma 13q34 (Emanuel *et al.*, 1986; Boyd *et al.*, 1988), COL4A3 y COL4A4, codificadoras de las cadenas  $\alpha 3$ (IV) y  $\alpha 4$ (IV), se localizan en el cromosoma 2q35-37 (Morrison *et al.*, 1991; Kamagata *et al.*, 1992) y, COL4A5 y COL4A6 se encuentran en el cromosoma Xq22 y codifican las cadenas  $\alpha 5$ (IV) y  $\alpha 6$ (IV) (Hostikka *et al.*, 1990; Oohashi *et al.*, 1994). Se ha sugerido la existencia de un único antepasado común para estos genes, que hoy estaría representado por la cadena  $\alpha 1$ (IV), y que sería duplicado e invertido para formar el locus  $\alpha 1/\alpha 2$ . Este locus sería posteriormente duplicado dos veces, primero para producir el par  $\alpha 3/\alpha 4$ , y después otra vez para producir el locus  $\alpha 5/\alpha 6$  (Hudson *et al.*, 1993; Miner y Sanes, 1994).

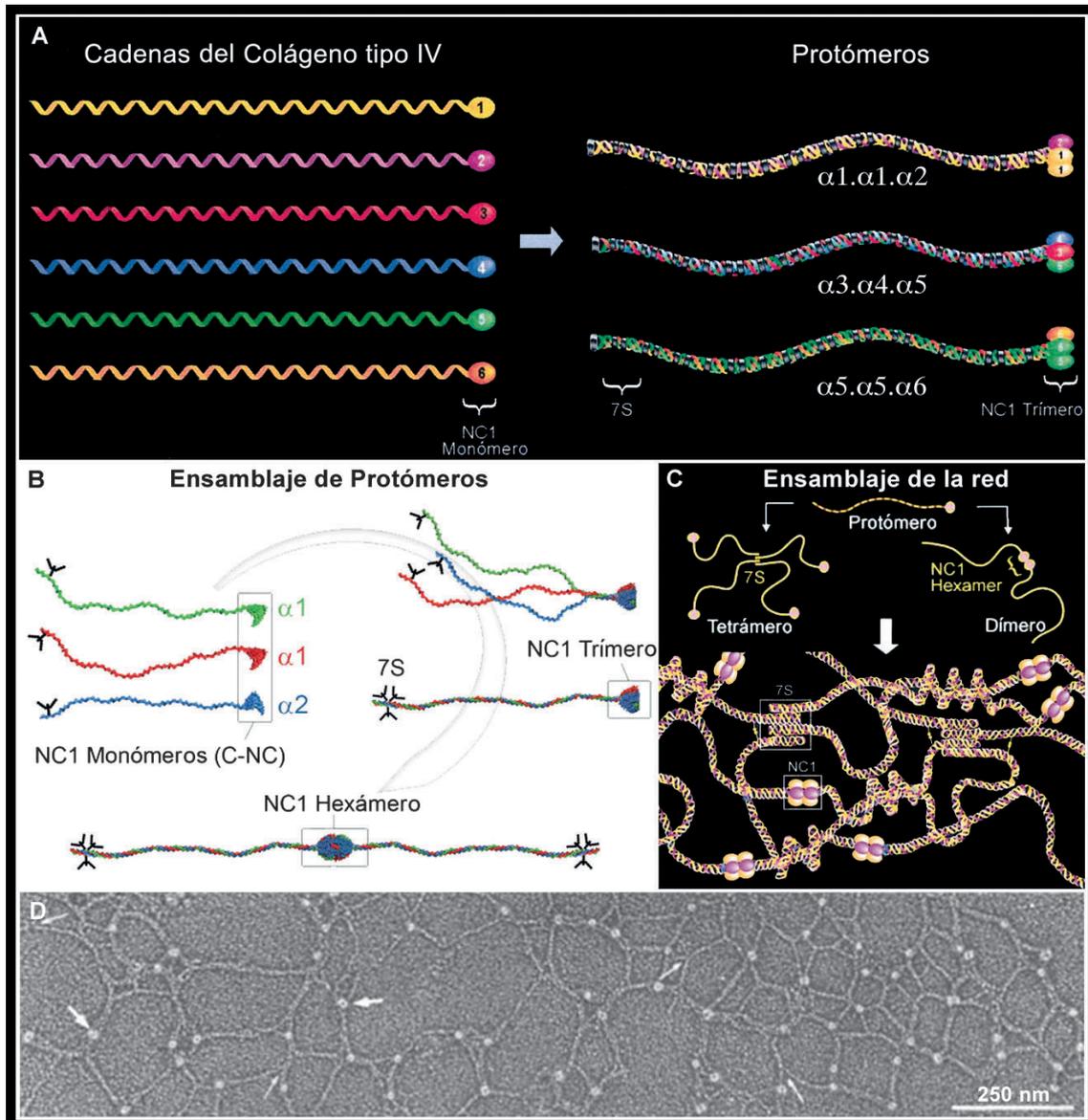
Las seis cadenas  $\alpha$  del colágeno IV identificadas, combinadas de tres en tres, permiten hasta 56 posibles combinaciones de moléculas triple helicoidales, denominadas protómeros. Sin embargo, sólo se forman tres tipos específicos de protómeros en mamíferos, que se designan como  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$ ,  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$  y  $\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(\text{IV})$  (Figura 2A) (Hudson *et al.*, 2003). El ensamblaje de los monómeros en protómeros, es un proceso de alta especificidad, ya que se inicia cuando el dominio NC1 de una cadena  $\alpha$  identifica y recluta otras dos cadenas  $\alpha$ , permitiendo la alineación y posterior enrollamiento de los monómeros, en sentido C-terminal  $\rightarrow$  N-terminal, para formar la triple hélice (Figura 2B) (Sundaramoorthy *et al.*, 2002). Recientemente, se ha descubierto que es el dominio NC1 de la cadena  $\alpha 2$  quien, por su alta afinidad por el dominio NC1 de  $\alpha 1$ , dirige la estequiometría molecular de cadenas y el ensamblaje del trímero  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  (Khoshnoodi *et al.*, 2006b), y es probable que sean sus cadenas homólogas,  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$ , las que dirijan la formación de los otros dos protómeros,  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$  y  $\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(\text{IV})$ .

Las redes de colágeno IV se forman en un proceso de autoensamblaje, mediante dimerización en el extremo C-terminal de dos dominios NC1, a través de interacciones de tipo puentes disulfuro y otros enlaces no reducibles, y por tetramerización en el extremo N-terminal de cuatro dominios 7S, también estabilizados por puentes disulfuro o enlaces covalentes (Figura 2C y 2D) (Timpl *et al.*, 1981). Además, los dominios de triple hélice pueden interactuar entre sí y con los dominios NC1 para dar lugar a estructuras superenrolladas (Siebold *et al.*, 1988).

El dominio NC1 del colágeno IV es de particular importancia ya que la especificidad de ensamblaje, tanto de protómeros como de las redes, está determinada por el reconocimiento molecular de secuencias específicas entre dominios NC1 (Timoneda *et al.*, 1990; Gunwar *et al.*, 1991; Sundaramoorthy *et al.*, 2002). Este dominio puede separarse del resto de la molécula de colágeno IV mediante digestión con colagenasa bacteriana, obteniendo un hexámero compuesto por subunidades monoméricas y diméricas (Wieslander *et al.*, 1984). Las subunidades que componen el hexámero, así como sus propiedades son variables en diferentes MBs (Langeveld *et al.*, 1988).

Los tres tipos de protómeros se ensamblan entre sí para formar las siguientes redes de colágeno IV:

- $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})-\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$
- $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})-\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$
- $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})-\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(\text{IV})$



**Figura 2.** A) Esquema de la formación de los tres protómeros de colágeno IV descritos hasta el momento, a partir de los monómeros [cadenas  $\alpha(\text{IV})$ ] (Sundaramoorthy et al., 2002). B) Ensamblaje y formación de la triple hélice de los protómeros, y dimerización de los mismos (Khoshnoodi et al., 2006b). C) Diagrama del ensamblaje de las redes de colágeno IV, con la formación de dímeros y tetrameros a partir de los protómeros. La interacción entre protómeros para formar dímeros tiene lugar a través de los dominios NC1, mientras que la asociación para formar tetrameros es por los extremos 7S amino terminal. La posterior unión de formas diméricas y tetraméricas dará lugar a la superestructura característica del colágeno IV, mostrada en la foto de microscopía electrónica D) (Yurchenco y Ruben, 1987).

Las cadenas  $\alpha$  del colágeno IV se expresan de forma selectiva en distintas MBs y en diferentes estadios del desarrollo, lo que sugiere funciones específicas para cada una de ellas (Hudson *et al.*, 1993). La red formada por  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})-\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  tiene una amplia distribución y está presente en todas las MBs, sin embargo las redes formadas por  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})-\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$  y  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})-\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(\text{IV})$  tienen una distribución tisular mucho más restringida (Hostikka *et al.*, 1990; Mariyama *et al.*, 1994; Leinonen *et al.*, 1994). De este modo,  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})-\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$  aparece en riñón (formando parte de las MB renales), pulmón, testículo, próstata y ojos, mientras que  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})-\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(\text{IV})$ , forma parte de las MBs de riñón, músculo liso, esófago, piel y bronquios en pequeña proporción (Hudson *et al.*, 2003).

En resumen, la composición en cadenas y las propiedades de las redes que forma el colágeno IV están influenciadas por dos factores. En primer lugar, la composición está condicionada por la disponibilidad de cadenas en cada tejido, ya que cada una muestra un patrón de expresión tejido-específico. En segundo lugar, el dominio NC1 confiere especificidad al ensamblaje de las cadenas, dirigiendo su selección para formar los protómeros de triple hélice, y la de éstos para formar las redes.

*Colágeno Tipo XV.* Es un colágeno no fibrilar, y se cree que es un homotrímero formado por tres cadenas colagenosas  $\alpha 1(\text{XV})$ . Es una molécula de colágeno altamente glicosilada, con un dominio de triple hélice central que se interrumpe por dominios NC, y dos dominios grandes NC en los extremos N-terminal y C terminal (Pihlajaniemi y Rehn 1995). Está ampliamente distribuido por distintas zonas de la MB de la mayoría de tejidos, con máxima expresión en corazón y músculo esquelético (Myers *et al.*, 1996). Los estudios realizados sobre este colágeno indican que tiene un papel importante en la estabilización de las células del músculo esquelético y la microvascularización (Eklund *et al.*, 2001), y el dominio NC C-terminal posee actividad anti-angiogénica (Kalluri, 2003).

*Colágeno tipo XVIII.* Está presente en diferentes tipos de MBs epiteliales y vasculares. Se expresan tres variantes del colágeno XVIII con diferencias en sus regiones N-terminal, aunque comparten múltiples dominios de triple hélice que se ven interrumpidos por regiones NC. Este colágeno posee cierta homología con el colágeno XV, y en el dominio globular NC del extremo C-terminal se encuentra el fragmento anti-angiogénico conocido como endostanina, que es susceptible a proteasas, las cuales

lo liberan acumulándose en sangre y en tejidos (Hägg *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 1998). Se cree que este colágeno contribuye al correcto desarrollo de la vascularización de la retina, y un splicing alternativo del colágeno XVIII se asocia con el síndrome de Knobloch, enfermedad que afecta a dichos vasos y que conduce a degeneración retiniana y ceguera, además de a otras anomalías.

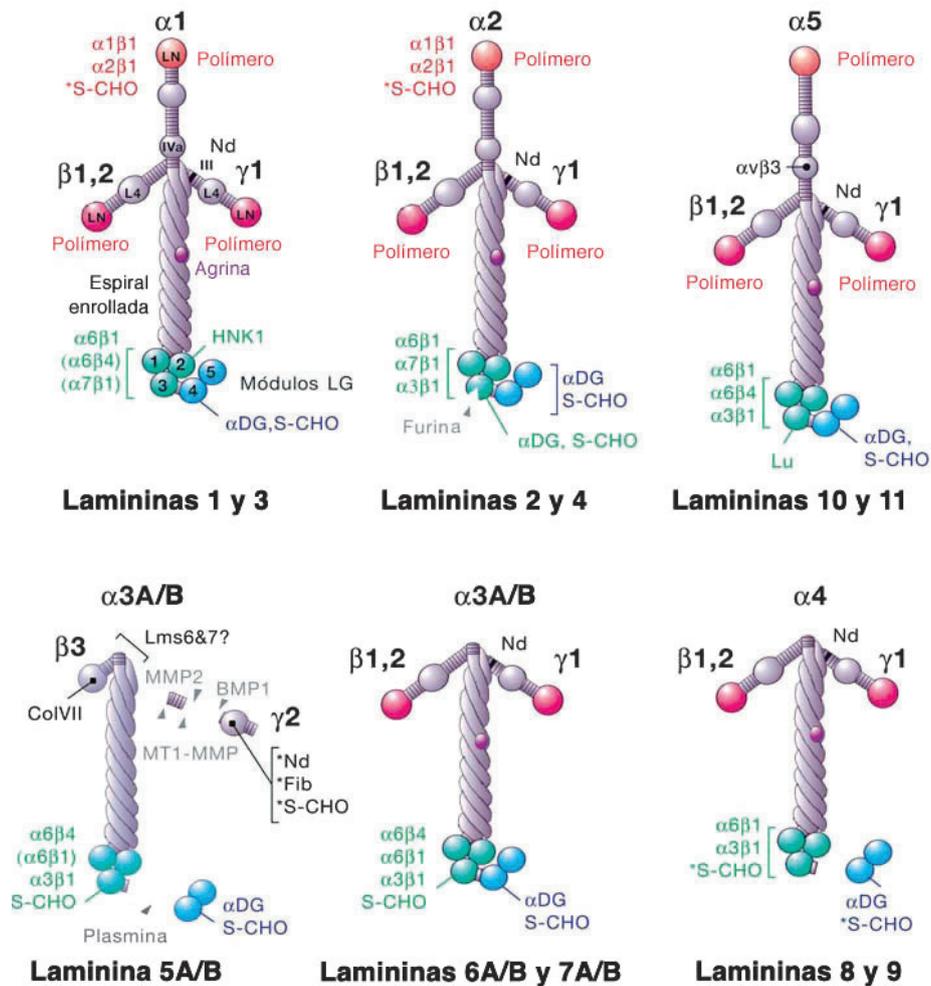
### 2.1.2. Lamininas

Es el componente no colagenoso mayoritario de las MBs. La laminina es una de las primeras proteínas de MEC sintetizadas durante el desarrollo embrionario. De hecho, en las primeras etapas del desarrollo, la MB tiene poco o incluso nada de colágeno IV y consta principalmente de una red de laminina. La laminina es un gran complejo flexible, cuyo peso molecular varía entre 500 kDa y 1000 kDa, y que mediante reducción se disocia en subunidades de 400 kDa y 200 kDa.

Las lamininas son una familia de glicoproteínas heterotriméricas formadas por tres cadenas polipeptídicas asociadas entre sí mediante interacciones iónicas y puentes disulfuro, para formar una estructura en forma de cruz asimétrica, con tres brazos cortos y uno largo (Timpl, 1989).

Hasta la fecha se han identificado cinco cadenas  $\alpha$ , tres cadenas  $\beta$  y tres cadenas  $\gamma$ , y además se ha encontrado que al menos tres cadenas ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\gamma 3$ ) presentan splicing alternativo (Colognato y Yurchenko, 2000). Cada laminina resulta de la combinación de una cadena  $\alpha$  con una  $\beta$  y una  $\gamma$ , dándose hasta 45 posibles heterotrímeros, sin considerar las variantes por splicing alternativo. Sin embargo, el número actual de lamininas identificadas en mamíferos es de 15 isoformas.

Las distintas cadenas de laminina son sintetizadas de forma tejido-específica por una amplia variedad de células. Por ejemplo, las células epiteliales expresan las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  y  $\gamma 2$ . Sin embargo el patrón de expresión para las cadenas  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 1$  es menos específico (Bosman y Stamenkovic, 2003).

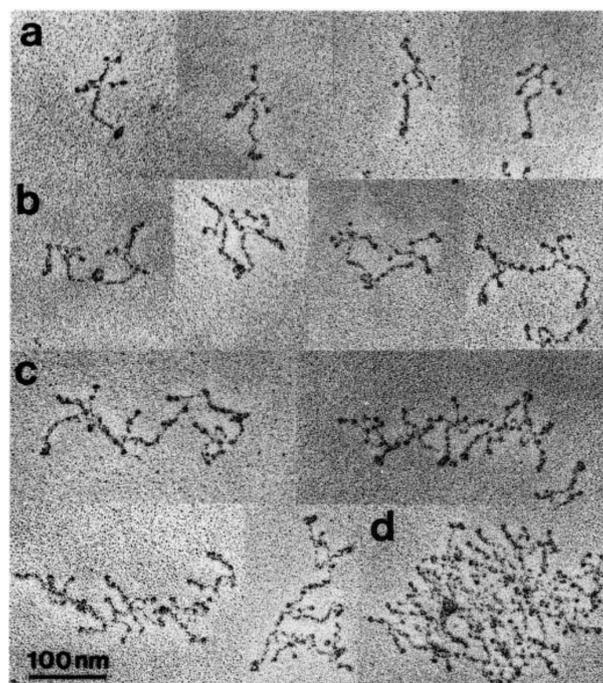


**Figura 3.** Estructura y actividades de la familia de lamininas. Se muestra la localización de los dominios de actividad, lo que incluye los destinados al andamiaje estructural de la MB [polimerización y unión de laminina a nidogeno (Nd), agrina, otras lamininas, y fibulinas (Fib)]; anclajes de superficie celular a través de sulfatidos (S-CHO), heparan sulfatos y moléculas relacionadas; HNK-1; e interacciones mediadas por integrinas (e.g.  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ) y  $\alpha$ -distroglicano ( $\alpha$ -DG). Las interacciones de baja afinidad se indican con asteriscos. También se muestran las zonas de corte de las proteasas (furina, MT1-MMP, MMP2, BMP1, plasmina) que causan la disociación de dominios distales en el caso de la laminina 5 (Miner y Yurchenco 2004).

Las lamininas que mejor se conocen, en términos de actividad funcional, son de la laminina 1 a la laminina 11 (Figura 3). Las lamininas 1 hasta la 4 poseen tres brazos cortos con dominios globulares N-terminales denominados laminina N-terminal (LN), dominios lineales similares a los motivos ricos en cisteína del factor de crecimiento epidérmico dispuestos en tándem y designados como laminina EGF (LE), y dominios globulares internos (L4, IV), todos ellos con idéntica distribución. Además, poseen un brazo largo en forma de espiral enrollada que acaba en un dominio globular C-terminal denominado dominio G (LG), presente únicamente en la cadena  $\alpha$ , y que está formado

por cinco módulos globulares distintos. La laminina 5 es la única que contiene las cadenas  $\beta 3$  y  $\gamma 2$ , y es una laminina en forma de varilla cuyos brazos cortos están truncados. Las lamininas 6 a 9 se caracterizan por carecer del brazo corto de la cadena  $\alpha$ , salvo por algunas repeticiones de LE. Las lamininas 10 y 11 poseen la cadena  $\alpha 5$ , con un número mayor de secuencias LE en el brazo corto (Miner y Yurchenco, 2004).

Se han identificado un gran número de actividades relacionadas con las lamininas, pero básicamente se pueden separar en interacciones que median el ensamblaje de la MEC (polimerización, unión a nidogeno y a otras macromoléculas de la MEC) a través de los brazos cortos, e interacciones con la superficie celular (con glicolípidos, proteoglicanos, y glicoproteínas que actúan como receptores, principalmente integrinas), mediadas por los dominios LN y LG de las cadenas  $\alpha$  (Miner y Yurchenco, 2004). Entre los efectos que las lamininas ejercen sobre las células, se incluyen adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. La laminina 1, por ejemplo, induce diferenciación en células epiteliales, y la laminina 5 tiene gran importancia como inductor de la migración celular y marcador de invasión en células epiteliales (Katayama y Sekiguchi, 2004).



**Figura 4.** Laminina y sus dímeros y oligómeros. Micrografías electrónicas de monómeros de laminina (a) y sus dímeros autoensamblados (b), oligómeros (c), y red polimérica (d) (Yurchenco y Schittny, 1990).

Al igual que el colágeno IV, la laminina tiene la capacidad de autoensamblarse espontáneamente, formando redes poliméricas *in vitro* a través de sus tres brazos cortos mediante interacciones calcio-dependientes (Figura 4). El ensamblaje *in vivo* debe de ocurrir por el mismo mecanismo, aunque también necesita del brazo largo para unirse a los receptores de la superficie celular (Cognato y Yurchenko, 2000).

Una de las funciones más importantes, que numerosos estudios atribuyen a la familia de lamininas, es la de mediadoras en la morfogénesis tisular en invertebrados y vertebrados, así como el papel crucial que desempeñan en la formación de los órganos. A medida que los organismos han ido evolucionando, las lamininas se han hecho más complejas con la aparición de múltiples cadenas, y una regulación espacial y temporal específica de dichas cadenas para ejercer una acción concreta en un tejido y un momento del desarrollo determinado (Nguyen y Senior, 2006). Por ejemplo, la MB glomerular inicialmente contiene laminina 1 ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ ) y después se sustituye por las lamininas 10 ( $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ ) y 11 ( $\alpha 5$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 1$ ), y por último cuando el riñón es maduro solo tiene laminina 11 (Miner y Patton, 1999).

Dado el gran número de funciones en las que las lamininas participan, no es extraño que aparezcan involucradas en diferentes procesos patológicos. Por ejemplo, la carencia de la cadena  $\alpha 2$  durante el desarrollo nervioso ocasiona una desmielinización de los nervios motores (Patton *et al.*, 1999), o también, mutaciones en las cadenas  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  postimplantación embrionaria resultan letales, con la imposibilidad de formar ningún tipo de MB (Smith *et al.*, 1999; Miner *et al.*, 2004). Además, ha sido ampliamente estudiado su papel en la invasión tumoral y metástasis, así como en la angiogénesis. Estos estudios han mostrado que la alteración de la interacción entre las células cancerosas y la MEC, viene acompañada de cambios importantes en la síntesis y composición de las cadenas de laminina (Patarroyo *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha revisado la nomenclatura y se ha propuesto que las lamininas se nombren de acuerdo a las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que la forman. Así por ejemplo, la laminina 10 ahora se designa como laminina 511 (Aumailley *et al.*, 2005).

### 2.1.3. Proteoglicanos

Los proteoglicanos (PGs) son un conjunto de macromoléculas localizadas en todos los tejidos y órganos de vertebrados. Están formadas por un esqueleto polipeptídico de longitud variable, que constituye la proteína núcleo o *core protein*, al que están unidas covalentemente una o varias cadenas de glicosaminoglicanos a través de residuos de serina o treonina, en secuencias específicas (Bourdon *et al.*, 1987; David, 1993).

Los GAGs son polímeros lineales no ramificados, formados por unidades repetidas de disacáridos, que contienen un derivado de un aminoazúcar (*N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina) y el otro azúcar suele ser un ácido urónico (glucurónico o idurónico). Al menos uno de los azúcares del disacárido posee un grupo carboxilo o sulfato, lo que lo carga negativamente. Estos voluminosos polianiones tienen la facultad de retener agua y cationes, así como de conferir a la MB una permeabilidad selectiva según la carga (Kasinath *et al.*, 1990).

Debido a su abundancia y diversidad estructural poseen una gran variedad de funciones entre las que destacan, su capacidad de unión a distintos factores de crecimiento (TGF- $\beta$ ), permitiéndoles participar en la modulación de diversos procesos del desarrollo, el proporcionar elasticidad a los diferentes tejidos así como mayor resistencia frente a actividad de proteasas y su participación en el ensamblaje de la MEC, al interactuar con proteínas de dicha matriz (Iozzo, 1998; Bernfield *et al.*, 1999).

El primer PG, propio de MBs, que fue caracterizado se aisló de tumor EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) de ratón (Hassell *et al.*, 1980). Presentaba baja densidad electrónica y consistía en una proteína núcleo de aproximadamente 400 kDa y tres cadenas de GAGs, de unos 100 nm de longitud y de 35 a 40 kDa. A este PG se le denominó perlecano, y ha sido clonado y secuenciado en ratón y en humanos (Jiang y Couchman, 2003).

La proteína núcleo del perlecano está dividida en cinco dominios que presentan homología con proteínas conocidas (Hassell *et al.*, 1980; Kallunki y Tryggvason, 1992). El dominio I es único para perlecano, el II presenta homología con el receptor de LDL, el III es homólogo a parte de las cadenas  $\alpha$  de la laminina, el IV es el más grande y presenta

similitudes con la molécula de adhesión celular N-CAM y el V presenta similitud con el dominio globular de la cadena  $\alpha$  de la laminina y de la agrina (Jiang y Couchman, 2003).

El perlecano se encuentra ampliamente distribuido en las MBs de la piel, el corazón, la glándula pituitaria, el timo, la próstata, el colon, el riñón, el pulmón, el oído y la placenta. En mamíferos, puede ser sintetizado por un gran número de células, como las epiteliales, epidérmicas, células musculares lisas, fibroblastos y condrocitos (Jiang y Couchman, 2003).

Durante mucho tiempo el perlecano fue el único heparan sulfato descrito, sin embargo numerosos trabajos han llevado a pensar que su función en el ensamblaje de la MB también podría ser llevada a cabo por otros PGs (Olsen, 1999). Entre ellos está la agrina, que presenta una estructura modular similar a otras proteínas de las MBs, y posee un extremo N-terminal que comienza con un péptido señal al que siguen una serie de dominios, dos de los cuales son ricos en residuos de treonina, serina y prolina. La agrina se expresa en muchos tejidos del organismo, como el riñón, pulmón, hígado o tiroides (Erickson y Couchman, 2000).

#### **2.1.4. Entactinas/Nidogenos**

Se descubrió a principios de los años ochenta como un componente ubicuo de la MB (Carlin *et al.*, 1981), y desde entonces se ha visto que aparece implicada promoviendo procesos de adhesión celular, quimiotaxis de neutrófilos y angiogénesis. Se cree que desempeña un papel importante en la formación y organización de la MB, por su habilidad para formar complejos con la laminina, el colágeno IV, el perlecano y las fibulinas, además de unirse a la superficie celular y a calcio (Erickson y Couchman, 2000).

La molécula tiene aspecto de pesa, y posee tres dominios globulares (G1, G2, G3) de diferente tamaño y distintas funciones. La región globular C-terminal (G3) se une al brazo corto de la laminina, concretamente a la cadena de laminina  $\gamma$ 1. La afinidad del complejo formado es muy alta, hasta el punto que en preparaciones de laminina aparece esta molécula como contaminante (Takagi *et al.*, 2003). El dominio G2 por su parte es

capaz de unirse al perlecano (Kvansakul *et al.*, 2001). El nidogeno también se une al colágeno IV a través de la región C-terminal de su triple hélice, lo que ha permitido postular que puede servir de puente de unión entre las redes de laminina y de colágeno IV (Timpl y Brown, 1996). También es posible la asociación de varias moléculas de nidogeno entre sí a través de sus dominios N-terminales.

La importancia de la interacción entre esta molécula y la laminina se manifiesta al utilizar anticuerpos que bloquean los sitios de unión en la laminina, perturbándose la organogénesis y la formación de MB, y produciendo necrosis celular del riñón en estado embrionario y en cultivos de células pulmonares (Ekblom *et al.*, 1994). Sin embargo, ratones knockout para el nidogeno-1 solo muestran leves anomalías, ya que el nidogeno-2 es capaz de compensar la pérdida del nidogeno-1 (Kimura *et al.*, 1998).

Otros trabajos, muestran que ratones knockout homocigotos para las dos moléculas de nidogeno presentan múltiples defectos y mueren al nacer debido a una incompleta maduración de los pulmones, así como a un desarrollo alterado del riñón y del tracto urinario. Los defectos pulmonares se caracterizaron por una MB discontinua y engrosamiento del tejido conectivo que rodea al alveolo. Además, prácticamente el 90% de los embriones perdieron uno o los dos riñones (Willem *et al.*, 2002).

#### **2.1.5. Osteonectina y Fibulina**

En la MB podemos encontrar otras proteínas accesorias que también participan en su estructura, y que están presentes en mayor o menor medida en las MBs de los distintos tejidos. Las más relevantes son osteonectina y fibulina.

*Osteonectina*. Se aisló por primera vez en el tejido óseo (Termine *et al.*, 1981) y de ahí su nombre. Paralelamente, en trabajos realizados en células endoteliales, en endodermo parietal y en tumor EHS, se aislaron proteínas con igual tamaño que se denominaron SPARC o BM40. La determinación de la estructura primaria de osteonectina, de SPARC y de BM40, evidenciaron que las tres proteínas eran idénticas. Presentan una amplia distribución tisular, aunque son mucho más abundantes en tejido óseo (Lindblom y Paulsson, 1996).

*Fibulina*. La fibulina-1 fue descrita como una proteína que se une a un dominio citoplasmático de integrinas (Argraves *et al.*, 1989). Es una típica proteína de secreción con una estructura compuesta por tres dominios (I, II y III) (Argraves *et al.*, 1990). Se enmarca dentro de una familia de proteínas relacionadas genéticamente, en la que al menos encontramos un miembro más, la fibulina-2, que es expresada por células de mamífero (Pan *et al.*, 1993).

#### **2.1.6. Metaloproteasas de Matriz e Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas**

Las MBs no son estructuras estáticas y están constantemente renovándose (Bosman y Stamenkovic, 2003). La degradación de la MB es un proceso complejo llevado a cabo mediante múltiples pasos, y que implica a una familia de endopeptidasas Zn-dependientes conocidas como metaloproteasas de matriz (MMPs). Estas enzimas, relacionadas estructuralmente entre sí, son capaces de hidrolizar los componentes de la MB, jugando un papel crucial en muchos procesos biológicos como embriogénesis, remodelación tisular, cicatrización de heridas y angiogénesis, y en diversos procesos patológicos como asma, enfermedad obstructiva crónica, aterosclerosis, artritis, o cáncer (Toi *et al.*, 1998; Forget *et al.*, 1999; Kheradmend y Rishi, 2003; Demedts *et al.*, 2005; Greenlee *et al.*, 2007).

Estas enzimas se caracterizan por la presencia del ión  $Zn^{+2}$  en sus centros activos, imprescindible para su actividad catalítica. Además, es necesaria la presencia de iones  $Ca^{+2}$  para alcanzar su máxima actividad. Se secretan en forma inactiva, como pro-MMPs que requieren la liberación de su centro activo para su activación. Sus principales inhibidores son los denominados inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP), y el balance entre los niveles de MMPs y TIMPs es un determinante importante de la renovación de la MB *in vivo* (Overall *et al.*, 1989).

Todas las MMPs presentan secuencias de gran homología y un multidominio común. Cada miembro de la familia contiene un dominio catalítico y un número variable de dominios adicionales. Las gelatinasas, uno de los seis grupos en que se clasifican las MMPs, degradan colágeno IV y gelatinas. Este grupo incluye la gelatinasa A y B, aunque es más común designarlas como MMP-2 y MMP-9, de 72 kDa y 92 kDa respectivamente (McDonnell *et al.*, 1994).

La MMP-2, ampliamente distribuida, aparece en la MEC (secretada por células mesenquimáticas), en leucocitos polimorfonucleares y en plasma. Su principal función es participar en la renovación de la MB. El análisis de su estructura primaria revela que se trata de una molécula modular, que contiene un prodominio con un grupo amino terminal cuya pérdida genera la activación de la enzima, y tres dominios diferentes, en uno de los cuales se encuentra el centro activo que contiene el ión  $Zn^{+2}$  (Collier *et al.*, 1988; Huhtala *et al.*, 1990a; Huhtala *et al.*, 1990b; Collier *et al.*, 1991).

La MMP-9 es producida por células mesenquimáticas activadas en cultivo, macrófagos alveolares y granulocitos, y es un producto importante de células tumorales. Junto con la MMP-2 son las principales enzimas encargadas de la renovación de la MB, y juegan un papel importante en procesos de metástasis (Wilhelm *et al.*, 1989; Masure *et al.*, 1991; Van Ranst *et al.*, 1991; Sato y Seiki, 1993). Puede aparecer en forma de homodímero uniendo dos moléculas mediante puente disulfuro, o como heterodímero uniéndose a otra proteína de 25 kDa. Su estructura molecular es similar a la de MMP-2 conteniendo un prodominio y tres dominios diferentes más.

Los TIMPs son proteínas solubles sintetizadas por las células del tejido conectivo, con un peso molecular que oscila entre 21 y 30 kDa (Goldberg *et al.*, 1989). Han sido identificados cuatro clases de TIMPs en vertebrados, que varían en su especificidad para inhibir diferentes MMPs (Sternlicht y Werb, 2001). Los mejor caracterizados son TIMP-1, glicoproteína de 28 kDa, y TIMP-2, una proteína no glicosilada de 23 kDa (Docherty *et al.*, 1985; Stetler-Stevenson *et al.*, 1989).

Estudios estructurales han mostrado que se unen, mediante enlaces no covalentes y reversibles, a través de su grupo N-terminal con cuatro enlaces de coordinación al  $Zn^{+2}$  de las MMPs, formando fuertes complejos 1:1. Los TIMPs afectan al dominio catalítico de las mismas, lo que resulta en una inhibición de su actividad hidrolítica (Sternlicht y Werb, 2001).

Los TIMPs regulan negativamente la actividad de MMPs durante la renovación de la MB. En células endoteliales y tumorales una reducción en la expresión de TIMPs aumenta su capacidad invasiva, afectando a la MEC de los tejidos vecinos. Se ha demostrado que los TIMPs son capaces de inhibir la invasión celular, la formación de

tumores, la metástasis y la angiogénesis *in vitro* (Hoegy *et al.*, 2001). Además, pueden desempeñar otro tipo de funciones, como por ejemplo actuar como agentes mitogénicos en diferentes tipos de células (Sternlicht y Werb, 2001).

## 2.2. Ensamblaje de la Membrana Basal

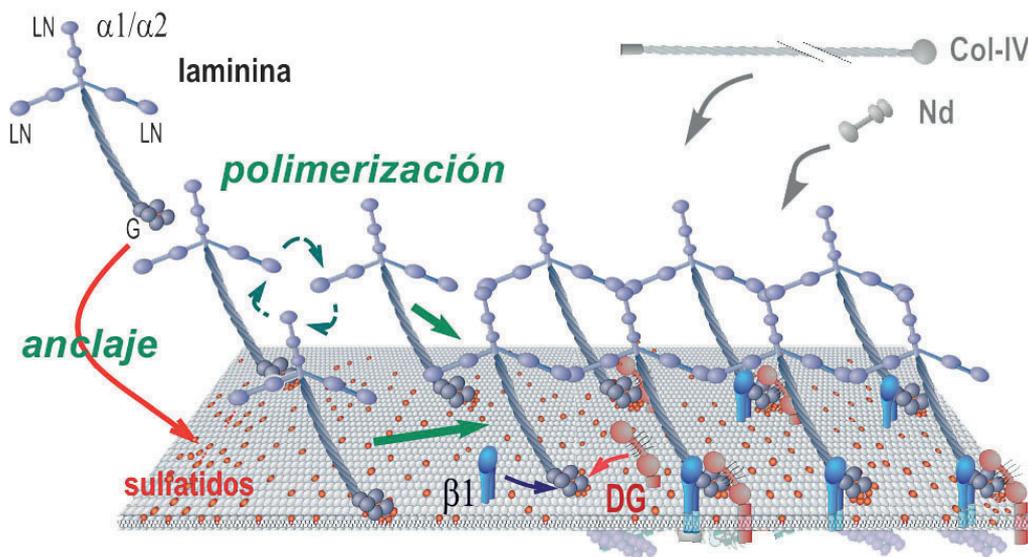
Uno de los rasgos más interesantes de la MB es la capacidad de sus componentes de autoensamblarse a través de sitios de unión específicos. El colágeno IV y las lamininas contienen en su estructura primaria la información necesaria para autoensamblarse formando polímeros con estructuras en forma de lámina. Por otro lado, proteoglicanos, entactina/nidogeno y otros constituyentes de las MB no son capaces de formar este tipo de estructuras por si mismos (Timpl y Brown, 1996; Kalluri, 2003).

Como ya se ha dicho, actualmente el modelo de MB más aceptado comprende la existencia de dos redes poliméricas, una de colágeno IV y otra de laminina que constituyen la estructura básica de la MB. Estas dos redes están superpuestas, y estabilizadas por entactina/nidogeno y perlecano, que las interconectan haciendo de puente. Evidencias genéticas de los últimos años indican una jerarquización en el proceso de formación de la MB, en donde la polimerización de laminina 1, la isoforma más importante en el desarrollo temprano, actuaría como el andamiaje para el reclutamiento del resto de componentes de la MB (Li *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2004).

La formación de la MB empieza con la secreción celular de los protómeros de colágeno IV y los heterotrímeros de laminina, ensamblados en el aparato de Golgi, junto con la entactina/nidogeno y el perlecano. Una vez fuera de la célula las moléculas de laminina se unen a la superficie celular, a través de uniones a sulfatidos (sulfoglicoesfingolípidos), y polimerizan formando una red a la que se unirán los demás componentes de la MB. Hay evidencias, en distintos estudios, que demuestran que estos procesos son en gran medida un único proceso de autoensamblaje (Smirnov *et al.*, 2002; Yurchenco *et al.*, 2004; Saohua *et al.*, 2005).

Se propone que los sulfoglicoesfingolípidos, presentes en las membranas lipídicas celulares, facilitan la polimerización de la laminina gracias a que la unión específica entre

las dos moléculas, a través del dominio LG de la cadena de laminina  $\alpha 1$ , permite un aumento de la concentración local de laminina en la superficie celular (Figura 5) (Ishizuka, 1997). Entonces la red de colágeno IV, autoensamblada a partir de sus protómeros, se une a la red de laminina a través de la entactina/nidogeno y el perlecano (Figura 1). El dominio globular G3 del entactina/nidogeno se une al dominio tipo EGF del brazo corto de la laminina  $\gamma 1$ , y actúa como puente de unión entre la laminina y el colágeno IV (Mayer *et al.*, 1993; Timpl y Brown, 1996).



**Figura 5.** La laminina se une a los sulfatidos (lípidos de membrana, en naranja) a través del dominio LG y polimeriza creando una estructura incipiente de MB, que captura y une el colágeno IV y el nidogeno. Estos pasos de autoensamblaje son independientes de aquellos de unión de la MB a distroglicano (DG, en rojo) y a  $\beta 1$ -integrinas ( $\beta 1$ , en azul) (Li *et al.*, 2005).

Los componentes de la MB incipiente deben unirse a receptores celulares, de tipo transmembrana, para poder desarrollar las funciones de señalización sobre las células. Principalmente dos clases de receptores se encargan de transmitir a la célula las señales provenientes de la MB, el distroglicano y las integrinas (Li *et al.*, 2005).

La secuencia de ensamblaje de esta hipótesis, y la creencia de que la laminina es la única molécula crucial para la formación de la MB durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, se apoyan en que la supresión de la cadena laminina  $\gamma 1$  durante el periodo de periimplantación de los embriones tiene consecuencias fatales (Smyth *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005).

Estas observaciones y el hecho de que no haya ningún modelo, hasta la fecha definitivo, que describa la organización molecular de los componentes de la MB en embriones, plantea distintas cuestiones. Por ejemplo, todavía está abierta la discusión sobre si la laminina es por sí sola suficiente o requiere de otras moléculas para su estabilización. La ausencia de uno solo de sus componentes, como la entactina/nidogeno, el perlecano o incluso el colágeno IV permite la formación inicialmente de matrices mínimas similares a la MB, que pueden desempeñar al menos algunas de las funciones básicas de las MBs, pero no son completas ni estructural ni funcionalmente (Pöschl *et al.*, 2004).

El trabajo con ratones knockouts para los genes COL4A1 y COL4A2 muestra cómo sus embriones se desarrollan hasta el día E10-E11, indicando que el colágeno IV es prescindible durante el desarrollo temprano, pero que es esencial para la integridad estructural de estas matrices en estadios posteriores. En estos embriones, deficientes en colágeno IV se observa una desintegración local de las MBs en días posteriores, probablemente debido a la estabilidad reducida de los agregados (Pöschl *et al.*, 2004).

### 2.3. Funciones de la MB

Las MBs desempeñan una gran variedad de funciones biológicas, desde organización de los tejidos hasta sus funciones como reservorios de factores de crecimiento. La MB proporciona soporte estructural y organiza las monocapas celulares durante el desarrollo tisular, siendo responsables de la compartimentalización y del mantenimiento de la arquitectura tisular. Su estado determina la reparación de los tejidos dañados y proporcionan anclaje a las células vecinas, además de mantener su estado de polarización y diferenciación. También son barreras selectivas para la filtración de macromoléculas. Y controlan la migración, invasión y diferenciación celular, e intervienen en el desarrollo y en funciones celulares reguladas por factores de crecimiento (Abrahamson, 1986; Timpl, 1989; Hudson *et al.*, 1993; Kreis y Vale, 1993; Prockop y Kivirikko, 1995).

La MB actúa como barrera selectiva semipermeable en los riñones y pulmones de mamíferos. En los riñones, la red de colágeno IV  $\alpha3.\alpha4.\alpha5$ , los polímeros de laminina 10/11, y el perlecano proporcionan resistencia mecánica y propiedades de carga a la MBG,

que son necesarias para una filtración sanguínea apropiada. En los pulmones, la MB tiene una estructura muy parecida a la MB renal, como ya se ha comentado, y desempeña un papel muy importante de filtración durante la respiración, eliminando del aire partículas de pequeño tamaño (Hudson *et al.*, 1993; Lebleu *et al.*, 2007).

Las proteínas que integran la MB poseen múltiples dominios de unión a moléculas de adhesión celular. La unión de receptores celulares a proteínas de MB activa rutas de señalización intracelular que influyen en el comportamiento celular. Los componentes de la MB dirigen la diferenciación celular e inhiben o promueven la proliferación y la migración (Perry *et al.*, 2006). La remodelación de la MB es un proceso que se induce cuando se daña la MB en lesiones y procesos patológicos, como la neoplasia o el asma (Kalluri, 2003; Shahana *et al.*, 2005). La remodelación de la MB consiste en la deposición de proteínas de la MB de novo, su autoensamblaje y la formación de nuevas redes de MB. Durante estos procesos, el comportamiento de las células está influenciado por la composición alterada de la MB, y por la exposición de dominios de unión encriptados. Estos cambios promueven ciertas actividades celulares que ayudan a reparar los tejidos dañados, como el reclutamiento de células inmunitarias y activación de fibroblastos (Kalluri, 2003).

Además, la MB secuestra factores de crecimiento (GFs) que afectan al comportamiento de las células durante la remodelación de la MB. Las reservas del GF vascular endotelial (VEGF) en la MB vascular se liberan durante la remodelación de la MB. El VEGF es un potente factor proangiogénico que activa la formación de nuevos vasos sanguíneos en el lugar dañando. En este sentido, el perlecano debe de tener un rol crítico en la remodelación de la MB, ya que protege ciertos dominios de las moléculas que la componen frente al ataque proteolítico y la degradación. Además, interacciona con reguladores proangiogénicos y antiangiogénicos, promoviendo el crecimiento tumoral y la angiogénesis en tumores (Gengrinovitch *et al.*, 1999; Neufeld *et al.*, 1999).

Las estrategias de deleciones genéticas en ratones de los cuatro componentes mayoritarios que componen las MBs, están proporcionando numerosos indicios acerca de sus funciones. Los diversos fenotipos de ratones mutantes, resultado de la eliminación genética o la mutagénesis dirigida de los genes que codifican para estos componentes demuestra su importancia en las funciones de los órganos. Algunos de estos fenotipos mimetizan desórdenes humanos peligrosos para la vida (Tabla 2).

Componente de la MB	Fenotipos de ratón mutante	Desorden humano
Colágeno tipo IV		
α1 mutación DelE40 (nula)	P0, hemorragia cerebral y porencefalia	Porencefalia hereditaria
α1 Bru, α1 Svc, α1 Raw (perdida parcial de la función)	Disgenesia del segmento anterior y glomerulopatía	
α1/α2	E9.5, membrana de Reichert mal estructurada	
α3, α4, α5	Letal en adultos, nefritis glomerular progresiva	Síndrome de Alport
α6		Leiomiomatosis difusa
Laminina		
α2	Letal en adultos, distrofia muscular, desmielinización de nervios periféricos	Distrofia muscular congénita
β2	Letal en adultos, disfunción renal con proteinuria; desarrollo anormal de la sinapsis neuromuscular	Síndrome nefrítico
β3/α3	P0-1, abrasión severa de la piel	Epidermolisis bullosa
γ1	E5.5, fallo del blastocito	
γ1 III4 (mutación del sitio de unión del nidogeno)	P0, agenesia renal y desarrollo pulmonar perjudicial	
Entactina/Nidogeno		
N1	Viable, fértil	
N2	Viable, fértil	
N1/N2	P0, defectos en el desarrollo pulmonar y en la integridad del tejido cardíaco	
Perlecano		
C15325Y, 4740G→A, IVS64+4A→G	Condrioplasia severa	Síndrome Schwartz-Jampel
DelE6 (nulo)	E10, hemorragia en el saco del pericardio	
Hspg2 (DelE2 HSstios de anclaje)	Viable, fértil, con degeneración de la cápsula del cristalino	

**Tabla 2.** Componentes mayoritarios de la MB, fenotipos de ratones mutantes y enfermedades humanas (Lebleu *et al.*, 2007).

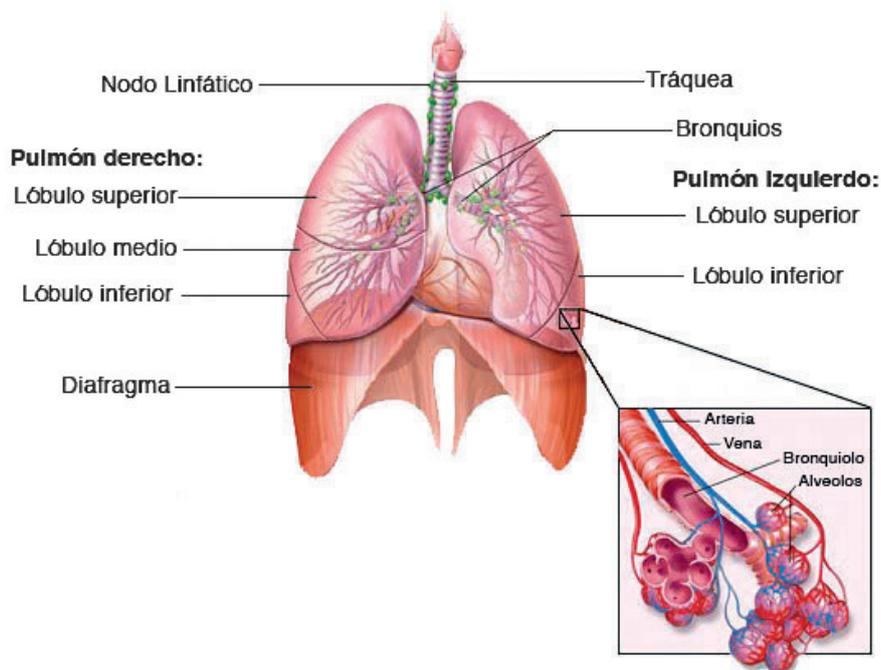
Los colágenos encontrados en la MB también tienen propiedades exclusivas, como es el caso del dominio NC1 (endostatina) del colágeno XVIII, cortado y liberado en procesos neoplásicos de remodelación de la MB. Es una molécula antiangiogénica, que limita el crecimiento de los tumores, inhibe la proliferación y migración de células endoteliales, e induce apoptosis de las células endoteliales en proliferación (O'Reilly *et al.*, 1997). Los dominios NC1 de las cadenas α1, α2 y α3 del colágeno IV (conocidos como arresteno, canstatina y tumstatina, respectivamente) también son liberados durante la remodelación de la MB por proteólisis, y poseen potentes propiedades antiangiogénicas (Marneros y Olsen, 2001; Kalluri, 2002). Así pues, los componentes de la MB y los GFs secuestrados en ella son críticos durante la remodelación de la MB, tanto en procesos fisiológicos como patológicos/neoplásicos (Lebleu *et al.*, 2007).

### 3. Fisiología Pulmonar

#### 3.1. Generalidades

Los tejidos de los animales superiores requieren oxígeno molecular ( $O_2$ ) para desarrollar los procesos metabólicos y producir energía. El aparato respiratorio se encarga de captar oxígeno y de eliminar anhídrido carbónico, que son transportados respectivamente hacia y desde los tejidos del organismo por el sistema circulatorio.

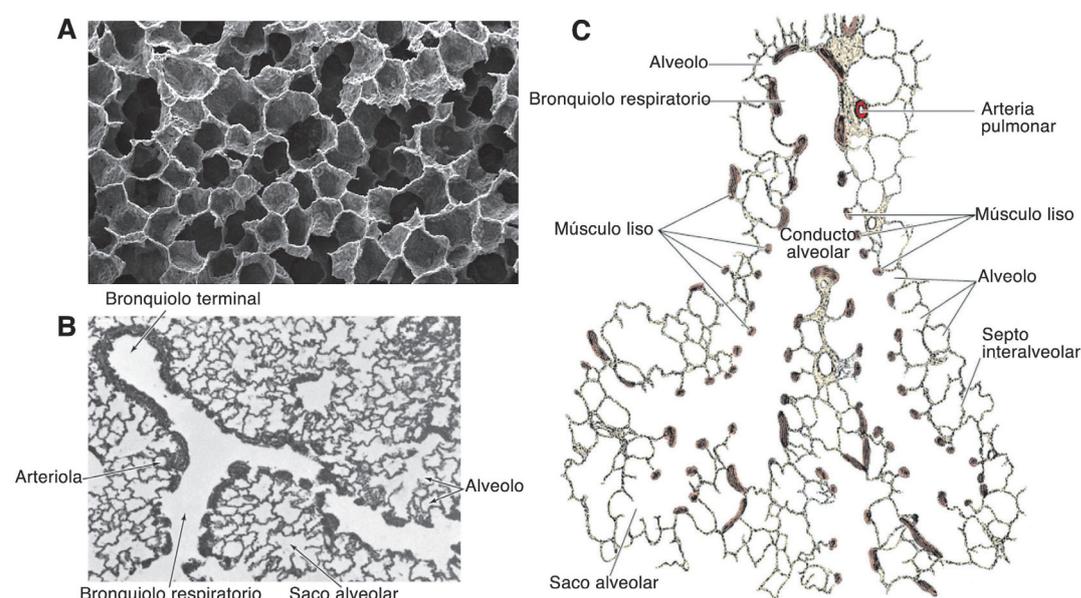
El aparato respiratorio puede dividirse, según la función que desempeña, en conducciones de aire y pulmones. Las conducciones de aire son tubos conductores que ponen en comunicación el ambiente exterior al organismo con los pulmones, donde tiene efecto el intercambio de gases entre la sangre y el aire. Estos tubos están constituidos por las fosas nasales, la faringe, la laringe, la tráquea y los bronquios de diverso calibre (Figura 6). Al final de las ramas más finas de las vías conductoras está la parte respiratoria de los pulmones, formada por muchas vesículas de pequeño tamaño llenas de aire, denominadas sacos alveolares y alveolos (Figura 6) (Junqueira y Carneiro, 2005).



**Figura 6.** Anatomía del sistema respiratorio, en el que se muestran la tráquea, los dos pulmones, con sus cinco lóbulos, el diafragma y una ampliación de la zona alveolar ([cancerinfo.tri-kobe.org](http://cancerinfo.tri-kobe.org)).

Los pulmones son unos órganos pares que ocupan la mayor parte de la cavidad torácica, y que constantemente cambian de forma y de tamaño durante las diferentes fases de la respiración. El pulmón derecho está dividido en tres lóbulos y el izquierdo en dos, cada uno de estos lóbulos recibe una rama del bronquio principal del lado correspondiente. La superficie externa de los pulmones está revestida de una membrana serosa, muy adherente, que es la pleura visceral. Cada uno de los cinco lóbulos pulmonares está dividido por finos tabiques de tejido conjuntivo, en un gran número de lobulillos de forma vagamente piramidal, que constituyen la unidad funcional del pulmón y cada uno de ellos está dispuesto con el vértice orientado hacia el hilio y la base hacia la superficie del pulmón.

Los bronquios que llegan a cada lóbulo de los pulmones se dividen dando origen a los bronquios secundarios, de los cuales se originan los bronquiolos de diverso tamaño. Cada bronquiolo terminal se continúa con uno, dos o más bronquiolos respiratorios que se dividen en los conductos alveolares, de 2 a 11 cada uno. Los conductos alveolares parecen tubos delgados con paredes discontinuas, que suelen seguir un trayecto largo y tortuoso, emitiendo varias ramas que, a su vez, vuelven a dividirse. Estos conductos están provistos de numerosas bolsas, de paredes delgadas, que son los sacos alveolares y que sólo se abren en el conducto alveolar (Figura 7) (Bloom y Fawcett, 1978).



De los conductos alveolares se originan alveolos únicos y sacos alveolares con dos, tres, cuatro o aun más alveolos. Los alveolos son sacos poliédricos, de paredes delgadas y abiertos por un lado, de modo que el aire pueda difundirse libremente de los conductos alveolares a los sacos alveolares y las cavidades de los alveolos. La característica más notable de la pared alveolar es una densa red de capilares que se anastomosan sin dejar prácticamente espacios entre ellos, llenos de numerosos eritrocitos. El número total de alveolos oscila entre 200 y 600 millones, y su superficie total entre 40 y 100 metros cuadrados, dependiendo entre otros factores de la talla corporal.

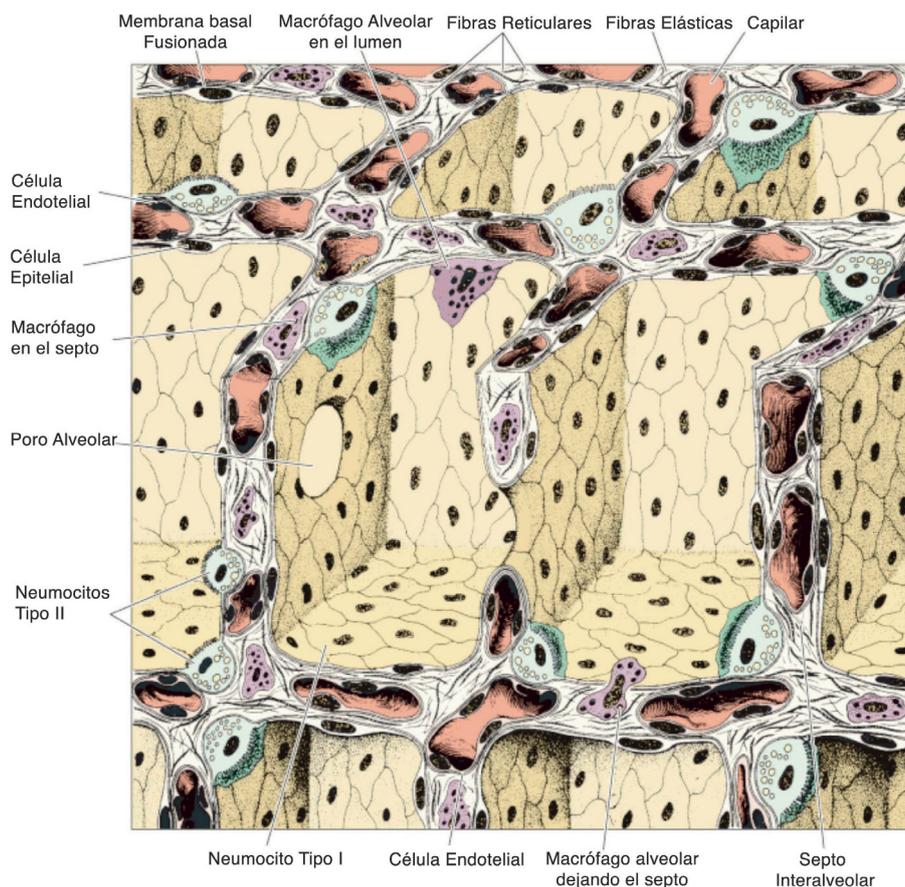
Las paredes o tabiques interalveolares están compuestas por las células que tapizan los alveolos adyacentes, y las estructuras que están entre los alveolos contienen una red muy compleja de fibras reticulares ramificadas, que junto con las numerosas fibras elásticas forman un tenue armazón de sostén para los sacos alveolares y los capilares que los rodean. Además, en las delgadas paredes que separan alveolos contiguos existen pequeños orificios, denominados poros alveolares, de 7 a 9  $\mu\text{m}$  de diámetro y situados entre capilares (Figura 8). En un tabique alveolar se pueden encontrar de uno a seis de estos poros (Bloom y Fawcett, 1978).

### **3.2. Alveolo pulmonar. Membrana Basal alveolocapilar**

Los alveolos pulmonares son las unidades funcionales de los pulmones en el proceso de la respiración, es la zona del pulmón donde se produce el intercambio gaseoso entre el aire y la sangre. Los alveolos son estructuras huecas, aproximadamente esféricas, de unos 250  $\mu\text{m}$  de diámetro que están rodeados por una intrincada trama de capilares, de luz amplia y anastomosados, de forma que hacen protusión en el interior de los alveolos y así la mayor parte de su superficie está en contacto con el aire alveolar (Figura 8).

El epitelio que recubre los alveolos forma una membrana continua con uniones herméticas entre las células que la componen. Los alveolos están tapizados por dos tipos de células epiteliales, las más numerosas son planas y reciben el nombre de neumocitos tipo I o células planas, y entre ellas están intercaladas otras células secretoras de mayor tamaño pero más escasas, conocidas como neumocitos tipo II o células septales (Cruz y Moreno, 2007).

Los *neumocitos tipo I* tienen un núcleo aplanado, muy parecido al de las células endoteliales o mesoteliales, y un citoplasma, a través del cual difunden los gases entre los capilares y los alveolos, que se hace delgado y atenuado más allá de la región perinuclear (Figura 9). Se estima que alrededor del 90% de la superficie alveolar está recubierta por neumocitos tipo I, aunque constituyen menos del 40% de sus células epiteliales.



**Figura 8.** Diagrama esquemático tridimensional de los alveolos pulmonares, en el que se muestra la estructura del septo alveolar (Junqueira y Carneiro, 2005).

Los *neumocitos tipo II* tienen forma cuboidal, son más numerosos que los anteriores y están localizados principalmente en las uniones de los septos alveolares. Entre otras numerosas funciones sintetizan el surfactante pulmonar, tensoactivo que disminuye la tensión superficial de la capa de líquido que recubre la superficie interna de los alveolos, impidiendo así el colapso alveolar y participando en la defensa del pulmón. Las proteínas A y D del surfactante (lectinas) contribuyen a los procesos de fagocitosis alveolar, al igual que en la respuesta innata inmunológica del pulmón. Además, los neumocitos tipo II son responsables de las funciones metabólicas del pulmón.

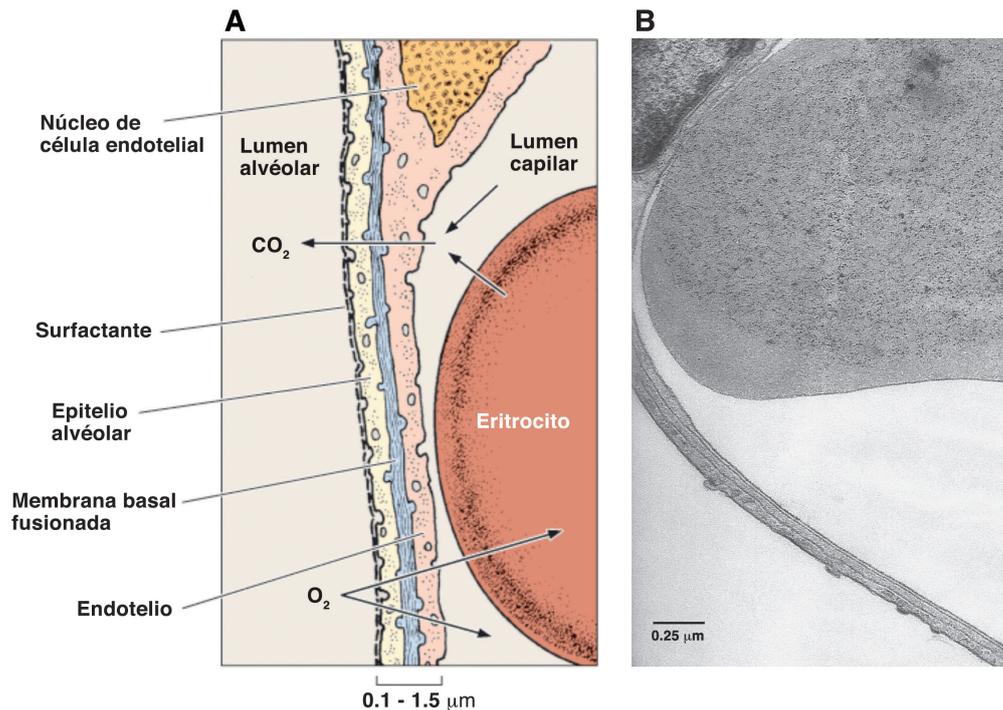
Cuando los neumocitos tipo I son destruidos en algunas enfermedades, los neumocitos tipo II activan su función progenitora de los anteriores y proliferan para reparar los daños en el epitelio pulmonar. La proliferación e hiperplasia de los neumocitos tipo II, seguida de una transdiferenciación, son signos inequívocos de daño epitelial y ayudan a restaurar la barrera aire-sangre. Aunque no están claros los mecanismos moleculares que median los procesos de transdiferenciación (Furuyama y Mochitate, 2004; Bhaskaran *et al.*, 2007).

Aparte de estas células estructurales, dentro del alveolo y en el espesor de los tabiques, se encuentran células con un rol defensivo, especialmente *macrófagos alveolares*, que fagocitan las partículas extrañas y bacterias que llegan al alveolo. Los macrófagos cargados de detritus se eliminan junto con las mucosidades o retornan al espacio intersticial donde son captados por el sistema linfático.

La *pared alveolar* puede ser definida como la barrera a través de la cual pasan los gases entre el aire y la sangre. Funcionalmente, esta interfase aire-sangre está formada por una estructura trilaminar constituida por los neumocitos tipo I, con la membrana basal alveolar (MBA) subyacente y las células endoteliales capilares, también con su MBA (Figura 9). Como ya se ha dicho con anterioridad, las MBs del epitelio y endotelio están fusionadas, de forma que tanto los neumocitos como el endotelio comparten una delgada MB, cuyo espesor varía de 50 a 100 nm según la especie (Maina y West, 2005).

El intercambio gaseoso, durante la respiración, es un proceso de difusión pasiva a través de las membranas alveolares del pulmón, que sigue la física de la presión parcial de gases. En estos procesos, las propiedades estructurales de las membranas tienen una gran importancia en la tasa y el rendimiento de transferencia de gases. Y además, la capacidad de difusión es directamente proporcional a la superficie expuesta e inversamente proporcional al grosor de la membrana (Maina y West, 2005).

La MBA regula una gran variedad de funciones celulares, como adhesión, migración, proliferación y diferenciación, mediadas por las actividades biológicas de cada uno de sus componentes (Adachi *et al.*, 1997). Por otra parte, como el epitelio alveolar está siempre expuesto a estímulos externos, como tóxicos ambientales y microorganismos, la reepitelización y la reparación de la MB tiene una gran importancia en el mantenimiento de la función de barrera del tabique alveolar.



**Figura 9.** Tabique interalveolar, se muestra la barrera aire-sangre. A) Dibujo esquemático (Junqueira y Carneiro, 2005). B) Micrografía electrónica de transmisión de pulmón de rata.

La composición molecular de la MBA es compleja y sometida a cambios durante el desarrollo, comprende colágeno IV, laminina, entactina 1, colágeno V, condroitin sulfato, condroitin sulfato proteoglicano y heparan sulfato proteoglicano. Estos componentes están presentes en la MBA tanto en el desarrollo como en el individuo adulto, aunque algunos de ellos, principalmente la laminina y el colágeno IV presentan variaciones en las cadenas que los componen (Dunsmore y Rannels, 1996; Nguyen *et al.*, 2002a; Maina y West, 2005).

En el caso del colágeno IV las cadenas  $\alpha 1(\text{IV})$  y  $\alpha 2(\text{IV})$  se expresan de forma generalizada en todas las MBs del pulmón (alveolos, capilares, epitelio bronquial, y células musculares de la pared vascular y bronquial), mientras que las cadenas  $\alpha 3(\text{IV})$ ,  $\alpha 4(\text{IV})$ ,  $\alpha 5(\text{IV})$  y  $\alpha 6(\text{IV})$  tienen un patrón de expresión más restringido. Las cadenas  $\alpha 3(\text{IV})$  y  $\alpha 4(\text{IV})$  solo se expresan en los alveolos, y la cadena  $\alpha 5(\text{IV})$  lo hace en los alveolos, epitelio bronquial y células musculares, pero no en capilares. La cadena  $\alpha 6(\text{IV})$  solo se expresa en el epitelio bronquial en pequeña proporción. De forma que la MBA está compuesta únicamente por las redes  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$ - $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  y  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$ - $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$  (Nakano *et al.*, 2001).

En cuanto a la laminina, las cadenas laminina  $\alpha 1$  y laminina  $\alpha 2$  están presentes únicamente durante el periodo fetal, mientras que las cadenas laminina  $\alpha 3$ , laminina  $\alpha 4$  y laminina  $\alpha 5$  se encuentran en pulmones de fetos y de adultos (Miner *et al.*, 1997). Las cadenas laminina  $\alpha 1$  y laminina  $\alpha 5$  colocalizan en las mismas zonas del pulmón, pero la laminina  $\alpha 1$  sólo se expresa durante el primer trimestre del desarrollo mientras que la laminina  $\alpha 5$  lo hace al final de este periodo y continua en la etapa adulta (Pierce *et al.*, 2000). Las tres cadenas laminina  $\beta$  y las cadenas laminina  $\gamma 1$  y laminina  $\gamma 2$  se encuentran en fetos y adultos (Durham y Snyder, 1995; Utani *et al.*, 1995; Durham y Snyder, 1996).

### 3.3. Patología pulmonar. Alteraciones relacionadas con la membrana basal

La MEC, y en especial la MB, tiene una gran importancia en la diferenciación, mantenimiento y remodelación tisular. De acuerdo con esto, la organogénesis y posterior mantenimiento del tejido pulmonar se verán también influenciados por ella, y las posibles alteraciones que afecten a sus componentes podrán conducir a procesos patológicos en el pulmón. De hecho, se han asociado alteraciones en su estructura o composición con distintas patologías pulmonares (Bosch y Font, 1999; Kranenburg *et al.*, 2006; Ozşahin *et al.*, 2006; Postma y Timens, 2006; Sirianni *et al.*, 2006).

Como ya se ha comentado, los componentes principales de la MB en mamíferos son el colágeno IV y la laminina. Su composición varía en los distintos estadios del desarrollo, expresándose selectivamente las distintas cadenas que las componen, de manera que la pérdida, alteración o cambio en la cantidad relativa de alguna de las cadenas puede producir anomalías estructurales de las redes. Los cambios estructurales descritos en la MB comprenden engrosamiento, lamelación, depósitos de colágeno, plegamientos o interrupciones, y dan lugar a una gran variedad de enfermedades (Magro *et al.*, 2005). Concretamente, el engrosamiento de la MB con deposiciones de proteínas de la MEC, que aparece antes incluso que los fallos funcionales detectables, es característico de enfermedades renales y pulmonares como el asma y la diabetes (Miner y Sanes, 1996; Watanabe *et al.*, 1997; Brodeur *et al.*, 2007). El acumulo de proteínas de la MEC como colágenos (tipos I, III y IV) y laminina también se ha descrito en la enfermedad obstructiva crónica y la fibrosis pulmonar idiopática. La deposición de estas proteínas se correlaciona inversamente con la función pulmonar, sugiriendo su participación en el deterioro pulmonar (Kranenburg *et al.*, 2006).

*Asma.* El asma es un proceso inflamatorio crónico de las vías aéreas, en el que están implicadas muchas células y productos celulares. La inflamación crónica da lugar a una hiperrespuesta bronquial que conduce a episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos. Estos episodios se asocian habitualmente a la obstrucción del flujo aéreo, desencadenado por tres fenómenos que ocurren en el árbol bronquial broncoespasmo o broncoconstricción, inflamación e incremento de la secreción bronquial. El origen de estas alteraciones no responde a un mecanismo único, sino al resultado de diferentes vías patogénicas (Cabrera y Rodríguez, 2005).

En los pacientes con asma se observan una gran variedad de cambios morfológicos, como hipertrofia del músculo bronquial, hipertrofia glandular, depósitos de colágeno bajo la MB, engrosamiento de la MB y membrana reticular, gran infiltración celular de la mucosa bronquial por eosinófilos, áreas de descamación epitelial, hiperplasia de células caliciformes y taponamiento de pequeños bronquios por moco bronquial con detritus celulares. Este tipo de cambios sirven como indicadores de severidad del asma y del remodelado bronquial (Jeffery *et al.*, 2000; Vignola *et al.*, 2000; Stirling y Chung, 2001; Shahana *et al.*, 2005).

El engrosamiento de la MB es una alteración descrita recientemente en pacientes asmáticos, debido principalmente a que no es un efecto tan llamativo como el engrosamiento de la membrana reticular y requiere de microscopía electrónica para poder medirla, mientras que la membrana reticular mide alrededor de 5  $\mu\text{m}$  y se puede apreciar al microscopio óptico. Los cambios observados en la MB son incrementos del 50% y se deben principalmente al ensanchamiento de la lámina densa, permaneciendo inalterada la lámina lucida (Shahana *et al.*, 2005).

La membrana reticular del epitelio bronquial, compuesta por colágeno I, III y V, fibronectina y tenascina, y situada por debajo de la MB llega a aumentar su grosor hasta tres veces, y se considera uno de los cambios histológicos más llamativos asociados al remodelado bronquial en el asma (Jeffery *et al.*, 2000; Stirling y Chung, 2001). Distintos estudios mediante microscopía electrónica han puesto de manifiesto que dicho engrosamiento es causa de una deposición intersticial anormal de colágeno I, III y V, y otras proteínas de la MEC en la membrana reticular bajo el epitelio bronquial. Este proceso se conoce como fibrosis subepitelial, en la que la proliferación y deposición de

fibras de colágeno es consecuencia de la interacción, aun sin caracterizar, entre células epiteliales de los espacios aéreos y fibroblastos/miofibroblastos (Brewster *et al.*, 1990; Hoshino *et al.*, 1998; Redington, 2000).

Cambios en la expresión de distintas MMPs se han asociado con el asma, encontrándose aumentadas la MMP1, MMP2, MMP3, MMP8 y MMP9 en los septos y en los fluidos de lavados broncoalveolares de pacientes asmáticos (Demedts *et al.*, 2005). Además, en pacientes con asma severa, en relación a pacientes con asma moderada o los controles, la actividad de la MMP9 está aumentada en la MB subepitelial y acompañada de un incremento del TGF- $\beta$ . Lo que sugiere, en estos pacientes, un rol importante de los neutrofilos en los procesos de remodelación, ya que expresan ambas proteínas, la MMP9 y el TGF- $\beta$ , implicadas en la destrucción y reparación tisular respectivamente (Wenzel *et al.*, 2003).

*Diabetes.* La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que causa, a largo plazo, complicaciones importantes a nivel vascular, renal, retiniano y neuropático. Junto con estas patologías, se han encontrado alteraciones histopatológicas en los pulmones (Weynand *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2001). La DM insulino-dependiente (DM tipo I), en concreto, se ha asociado a una gran variedad de alteraciones del colágeno, la elastina y la MB en distintos órganos. En autopsias a pacientes con DM tipo 1 y 2 se ha detectado engrosamiento de la membrana reticular bronquial, la MBA y la MB renal (Watanabe *et al.*, 1997; Weynand *et al.*, 1999). La MBA se hace mas gruesa con el tiempo, a medida que avanza la enfermedad, y esto se refleja en las funciones de ventilación y en los parámetros de perfusión ventilatoria (Ozşahin *et al.*, 2006).

El primer cambio fisiopatológico derivado de las complicaciones microangiopáticas en la DM es el engrosamiento de la MB en los capilares. Este engrosamiento es continuo, homogéneo y global, habitualmente se duplica o triplica el grosor, y se debe a un aumento real de la cantidad de colágeno tipo IV, y una disminución relativa del heparán-sulfato (De Muro *et al.*, 2002). Aunque, por el momento, no se han descrito manifestaciones clínicas en el pulmón asociadas al engrosamiento de la MB, la nefropatía diabética es el efecto más llamativo de este engrosamiento en el riñón. Comienza con una alteración de la permeabilidad glomerular, que conduce a microalbuminuria y que luego progresa a macroalbuminuria, y termina produciendo glomeruloesclerosis e insuficiencia renal.

*Enfisema Pulmonar.* Se entiende como enfisema al aumento permanente y anormal de los espacios aéreos distales al bronquiolo terminal, que se acompaña de una disminución de la superficie alveolar a consecuencia de una destrucción de los tabiques alveolares. Entre los cambios ultraestructurales observados en el enfisema, hay zonas de la pared alveolar con deposición de colágeno y de elastina, y otras zonas donde el tabique se hace más delgado (Lang *et al.*, 1994; Vlahovic *et al.*, 1999).

La patogénesis del enfisema pulmonar todavía se desconoce, pero la hipótesis más aceptada se basa en el desequilibrio entre proteasas y antiproteasas. Así, el daño tisular resulta de la acción excesiva de las enzimas proteolíticas liberadas por las células inflamatorias, como neutrofilos y monocitos (Janoff, 1985; Stracher *et al.*, 1989; Shapiro *et al.*, 1991). Esta hipótesis está respaldada por estudios clínicos, que han observado incrementos en las cantidades de MMP8, MMP9 y MMP12 (Finlay *et al.*, 1997; Grumelli *et al.*, 2004). Esto produce una pérdida generalizada de tejido pulmonar y un aumento del grosor del intersticio en el tejido remanente, con mayor producción de colágeno y elastina (Vlahovic *et al.*, 1999).

En un estudio reciente, se demuestra que en los procesos enfisematosos se produce una disminución o desaparición de aperturas en la MB, lo que hace que disminuyan los contactos entre fibroblastos y neumocitos tipo II, y que desaparezcan los contactos entre fibroblastos y células endoteliales. Estos contactos están implicados en la comunicación entre epitelio-mesénquima necesaria para el desarrollo de los tejidos, y entre epitelio-fibroblastos para reparar zonas dañadas del pulmón (Siriani *et al.*, 2006).

*Síndrome de Goodpasture.* También llamado síndrome neuromorrenal, fue descrito, por primera vez, por Goodpasture en 1919 en un paciente de 18 años que presentaba un tipo agudo de hemorragia pulmonar y glomerulonefritis. En 1958, Staton y Tange utilizaron el término “síndrome de Goodpasture” en otros pacientes con características similares. Pero hasta 1967 no se probó la importancia patogénica de los anticuerpos anti-MB glomerular (anti-MBG) en algunos de los casos de hemorragia pulmonar y glomerulonefritis (Lerner *et al.*, 1967).

Se trata de una enfermedad autoinmune mediada por anticuerpos anti-MBG, que se unen a las MBs alveolar y glomerular, y cuyo antígeno se encuentra en el dominio

NC1 de la cadena  $\alpha 3(\text{IV})$  (Wieslander *et al.*, 1984; Saus *et al.*, 1988). Presenta un índice muy elevado de mortalidad que va del 75% al 90% si no se trata (Peters *et al.*, 1982). Los tres elementos esenciales para su diagnóstico son glomerulonefritis, inducida por anticuerpos anti-MBG y asociada a hemorragias pulmonares. De hecho, la presencia de estos anticuerpos circulantes es lo que permite distinguirla de otros desordenes que cursan igual, como el lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener o poliangeitis microscópica (Saxena *et al.*, 1995; Bosch y Font, 1999; Sugimoto *et al.*, 2007).

A pesar de las características en común de la MBA y de la MBG, solo algunos pacientes desarrollan hemorragias pulmonares. Los capilares alveolares carecen de aberturas o fenestraciones hacia la MB, lo que impide el paso de las IgGs. En condiciones normales, el endotelio alveolar actúa como barrera frente a los anticuerpos anti-MBG, pero los anticuerpos acceden a la MBA en situaciones en las que su permeabilidad está incrementada (Kelly y Haponik, 1994), como aumento de la presión hidrostática capilar, concentraciones altas de oxígeno, bacteremia, endotoxemia, exposición a hidrocarburos volátiles, o el tabaco, entre otras (Jones *et al.*, 1980; Rees, 1984; Ball y Young, 1998).

*Fibrosis pulmonar idiopática* (FPI). Es también conocida como alveolitis fibrosante criptogénica, es una forma específica de enfermedad pulmonar infiltrativa difusa de carácter fibrosante y etiología desconocida. Varios estudios han observado un engrosamiento llamativo de hasta casi seis veces, y una marcada lamelación de la MB. Además, se localizan depósitos anómalos de colágeno dentro de la MB, y se postula un origen autoinmune de la enfermedad (Magro *et al.*, 2006; Magro *et al.*, 2007).

Se ha implicado el aumento de TGF- $\beta$  en la progresión de la FPI, porque estimula la proliferación de los fibroblastos y activa la producción de moléculas de la MEC, como los colágenos I, III y IV, y la elastina, entre otros. Además, el TGF- $\beta$  aumenta la actividad de la MMP2 de forma dosis dependiente, pero no de la MMP9, sugiriendo que la fibrosis es consecuencia de un proceso de remodelación aberrante (Kasai *et al.*, 2005; Willis *et al.*, 2005; Sales *et al.*, 2006).

*Otros.* La MB es una estructura que se ha relacionado con una gran variedad de patologías pulmonares, pero en la mayoría de los casos es difícil discernir si las alteraciones observadas en la MB son causa o consecuencia de los procesos patológicos. Engrosamiento, lamelación, depósitos de colágeno, interrupciones o variaciones cuantitativas de sus componentes, son algunas de las alteraciones más llamativas y generalizadas descritas entre las enfermedades pulmonares ya mencionadas y además en otras, como cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasia, tuberculosis o en pacientes transplantados (Watanabe *et al.*, 1997; Law *et al.*, 2005; Magro *et al.*, 2005; Kranenburg *et al.*, 2006).

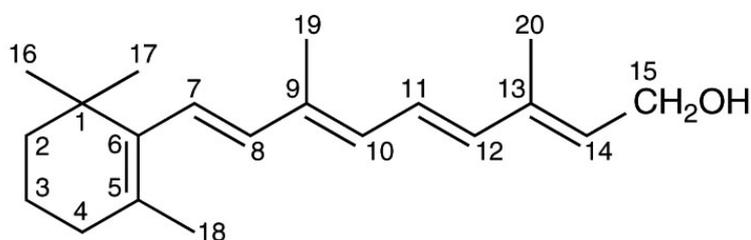
## 4. Vitamina A

La vitamina A es un micronutriente liposoluble esencial para los organismos superiores, y es el término genérico que se utiliza para agrupar a aquellos compuestos que presentan la actividad biológica del retinol, que participa en la visión y en mantener los tejidos epiteliales.

### 4.1. Retinoides y carotenoides

La vitamina A (*all-trans*-retinol) es un compuesto precursor de los retinoides naturales, moléculas química y biológicamente relacionadas con ella, que incluyen compuestos naturales con actividad vitamínica. Además, en la familia de los retinoides existen análogos sintéticos, que pueden presentar o no actividad vitamínica (Sporn *et al.*, 1984).

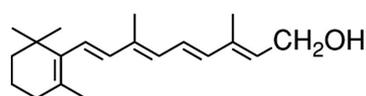
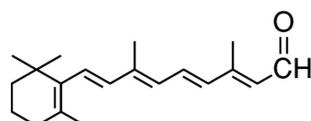
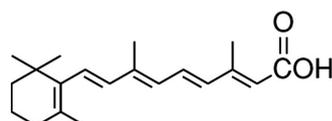
El *all-trans*-retinol es un alcohol primario de color amarillo pálido, cuya estructura deriva del isopreno. Está formado por cuatro unidades isoprenoideas  $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2]$ , que se estructuran en un anillo no aromático ( $\beta$ -ionona), una cadena poli-isoprenoide y un grupo alcohólico terminal (Figura 10). Esta estructura le confiere capacidad para transformarse metabólicamente e interactuar con las proteínas. También le proporciona unas propiedades similares a las de los detergentes, y sensibilidad a la luz ultravioleta y a la oxidación. (Vahlquist, 1999).



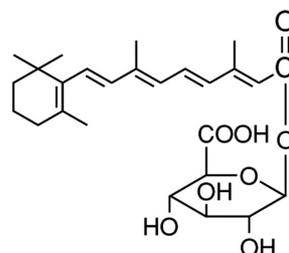
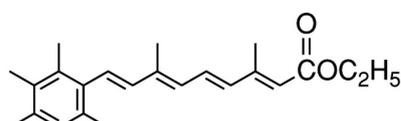
**Figura 10.** Estructura química de la vitamina A (*all-trans*-retinol) formada por cuatro isoprenoideas. Se distinguen tres partes: un anillo no aromático, una cadena poli-isoprenoide y un grupo  $\text{CH}_2\text{OH}$  final.

Los retinoides naturales poseen la misma estructura hidrocarbonada que el *all-trans*-retinol pero varían el grupo químico final, sustituyéndolo por un grupo aldérido en el caso del retinal y por un grupo carboxílico en el caso del ácido retinoico (Figura 11).

## RETINOIDES NATURALES

*all-trans*-retinol*all-trans*-retinaldehídoÁcido *all-trans*-retinoico

## RETINOIDES SINTÉTICOS

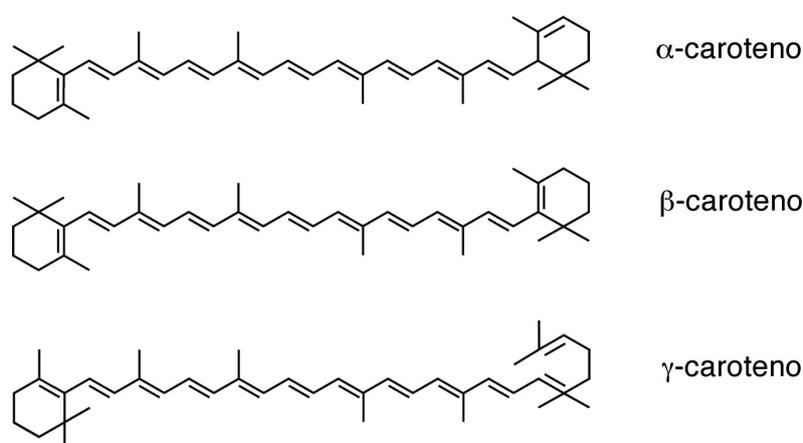
retinoil  $\beta$ -glucurónido

etretinato (análogo del ác. retinoico)

**Figura 11.** Estructuras químicas de algunos retinoides representativos. Las formas *all-trans* que se muestran son las que presentan mayor actividad biológica.

Los carotenoides son una familia de compuestos, de origen animal o vegetal, algunos de los cuales pueden formar vitamina A. Se han descrito aproximadamente 600 carotenoides diferentes, de los cuales solo unos 50 tienen actividad pro-vitamina A. El requisito que determina la actividad provitamina A es disponer al menos de un anillo  $\beta$ -ionona unido a una cadena poliénica de 11 átomos de carbono.

El carotenoide más activo es el  $\beta$ -caroteno (Figura 12), cuya estructura contiene dos anillos  $\beta$ -ionona, no sustituidos, unidos por su radical isopreno. De esta molécula se obtienen, mediante ruptura oxidativa central catalizada por la enzima  $\beta,\beta$ -caroteno 15,15'-dioxigenasa, dos moléculas de retinaldehído que posteriormente se reducen a retinol (Barua y Olson, 2000). En humanos la actividad de este enzima es muy baja, de forma que es muy pequeña la cantidad que se convierte en vitamina A, la proporción en la conversión es 12:1 ( $\beta$ -caroteno:retinol) (Baybutt y Molteni, 2007).



**Figura 12.** Estructura química de los principales carotenoides. Los tres carotenoides representados presentan actividad pro-vitamina A.

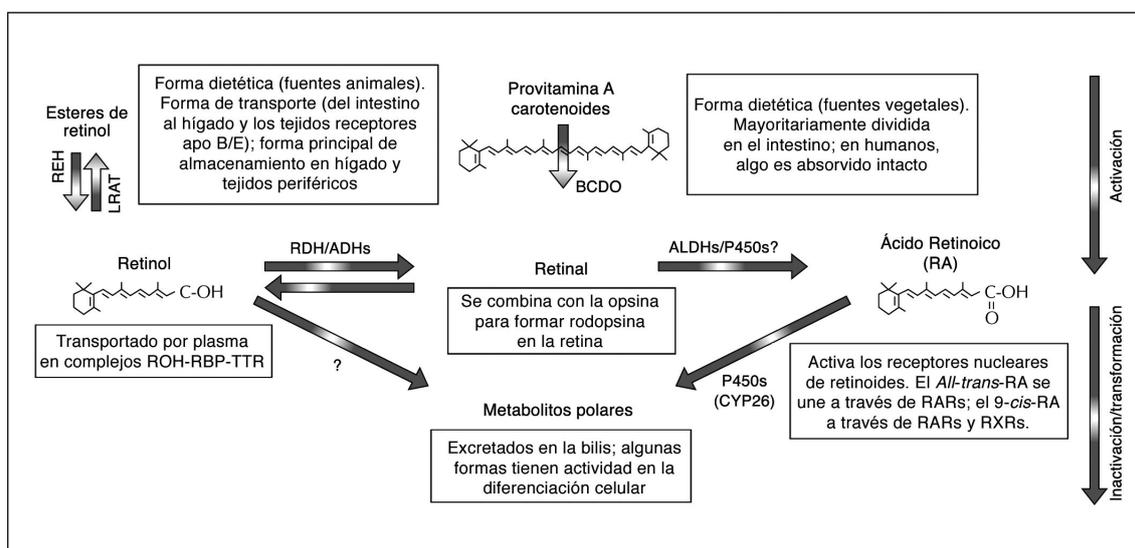
#### 4.1.1. Absorción, transporte y metabolismo

Las fuentes dietéticas de vitamina A son dos, vitamina A preformada, mayoritariamente ésteres de retinol (contenidos mayoritariamente en grasa, hígado animal y aceites de hígado de pescado), y provitamina A en forma de carotenoides vegetales (frutas y verduras) (Figura 13) (Furr y McGrane, 2003). Actualmente, las pautas dietéticas recomendadas de vitamina A se expresan en equivalentes de retinol, siendo 1 equivalente de retinol=1 mg de retinol ó 6 mg de  $\beta$ -caroteno. La equivalencia entre retinol y  $\beta$ -caroteno hace referencia al  $\beta$ -caroteno ingerido en una dieta mixta, ya que la biodisponibilidad de los carotenoides depende en gran medida de las características del alimento de procedencia, y en algunos de ellos, sobretodo en los de procedencia vegetal la equivalencia es bastante menor (Haskell *et al.*, 2004).

Los ésteres de retinol y carotenoides se hidrolizan a retinol y retinal (Figura 13), en el intestino delgado respectivamente, y para su correcta absorción es necesaria la presencia de grasas y bilis. En los enterocitos, el retinal es reducido a retinol por una reductasa microsomal, y junto al resto de retinol absorbido forma un complejo con una de las múltiples proteínas celulares de unión a retinol, la CRBP-II, y es esterificado. Los ésteres de retinol recién formados son incorporados en quilomicrones y transportados por el sistema linfático para ser absorbidos por los distintos tejidos, principalmente por el hígado (Furr y McGrane, 2003).

En el hígado los ésteres de retinol son hidrolizados, y el retinol obtenido se reesterifica en las formas de reserva de la vitamina A, palmitato y estearato de retinol, que se acumulan en vesículas lipídicas de células especializadas, las células estelares. En condiciones normales, más del 90% del total de vitamina A se almacena en estas células especializadas del hígado. A medida que se necesita retinol las células estelares hidrolizan los ésteres de retinol de reserva, y el retinol obtenido es transferido a los hepatocitos, donde se combina con la proteína de unión a retinol (RBP) y la transtirretina (TTR) para ser vertida al torrente circulatorio y llegar a los tejidos periféricos (Ross, 2005).

En los tejidos, el retinol de los complejos retinol-RBP-TTR y los ésteres de retinol transportados por quilomicrones son metabolizados por oxidación, bien para producir ácido retinoico en dos pasos, con el retinal como intermediario, o bien para su posterior inactivación con glucurónidos y excreción. En el proceso de producción de ácido retinoico, la oxidación de retinol a retinal es reversible y la llevan a cabo varios enzimas, la alcohol deshidrogenasa y una familia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta. Y el segundo paso de oxidación, que es irreversible, lo catalizan las isoenzimas de la retinal deshidrogenasa citosólica (RALDH) (Ross *et al.*, 2001; Ross, 2005).



**Figura 13.** Principales reacciones del metabolismo de retinoides. ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa; BCDO,  $\beta$ -caroteno dioxigenasa; LRAT, lecitín:retinol aciltransferasa; REH, éster de retinol hidrolasa; P450, enzimas de la familia de citocromos P450 (incluido el CYP26); apo, apolipoproteína; RA, ácido retinoico; RAR/RXR, receptores nucleares de ácido retinoico y de retinoides X (Ross *et al.*, 2001).

El ácido retinoico unido a las diferentes proteínas celulares de unión a ácido retinoico, CRABP, es transportado hacia los receptores nucleares para ejercer las diferentes funciones en las que interviene. El metabolismo y excreción del ácido retinoico está en parte regulado por su capacidad de inducir la expresión de las enzimas del citocromo P450, que oxidan el anillo  $\beta$ -ionona.

## 4.2. Propiedades y funciones de la vitamina A

La existencia de la vitamina A fue sugerida en 1913 por McCollum *et al.*, pasando a ser una de las primeras vitaminas descubiertas. Sin embargo, el espectro completo de sus actividades aún no está establecido por completo. Desde que sus primeras funciones fueron descritas por el mismo grupo de autores en la siguiente década, un gran número de descubrimientos científicos ha revolucionado el campo de los retinoides. La síntesis de nuevas estructuras con mayor actividad, incluso que el retinol y el ácido retinoico, ha permitido el avance en muchos de los campos vinculados a este grupo de compuestos.

La vitamina A y sus derivados, los retinoides, están implicados en importantes funciones fisiológicas, desde la visión y el crecimiento hasta la respuesta inmunitaria, la reproducción, el desarrollo embrionario y fetal, la detoxificación de fármacos, la diferenciación y proliferación celular, el mantenimiento tisular y la actividad potencial como antioxidantes fisiológicos (Ross, 1992; De Luca *et al.*, 1994; Means y Gudas, 1995; Livrea y Tesoriere, 1998; Zile, 1998; Palace *et al.*, 1999; Semba, 1999; Duester, 2000; Hansen *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2000; Baybutt y Molteni, 2007).

### 4.2.1. Funciones mediadas por receptores de retinoides

Gran parte de los retinoides ejercen sus funciones uniéndose a receptores específicos y modulando la expresión génica. Los receptores nucleares de los retinoides actúan como factores de transcripción activados por ligandos específicos, los estereoisómeros del ácido retinoico. Además, estos receptores se engloban dentro de la superfamilia de genes que incluye a los receptores de hormonas esteroideas, con quienes comparten propiedades estructurales y funcionales comunes (Evans y Kaye, 1999; Lippman y Lotan, 2000; Noy, 2000). Existen dos clases de receptores para retinoides, los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores

de retinoides X (RXR). En ambas subfamilias de receptores se ha caracterizado un dominio de unión a DNA y un dominio de unión específica al ligando, unidos entre sí por una región que sirve también como señal de translocación nuclear.

Tanto en humanos como en roedores se han caracterizado tres tipos de receptores RAR y tres tipos RXR, que se designan como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y cada uno de ellos tiene distintas isoformas. El ligando para los receptores RXR es el *9-cis*-retinoico, mientras que el receptor RAR une tanto las formas *9-cis*-retinoico como *9-trans*-retinoico. A pesar de la semejanza entre las dos subfamilias de receptores parece existir un papel específico para cada una en la señalización por retinoides. Se han desarrollado retinoides sintéticos con especificidad para los diferentes subtipos de receptores (Ribeiro *et al.*, 1995; Renaud y Moras, 2000).

Los receptores RAR y RXR pueden formar homodímeros entre si y unirse a segmentos específicos del DNA conocidos como elementos de respuesta (RARE y RXRE) que forman parte de los promotores de los genes regulados por el ácido retinoico. La presencia de alguno de estos elementos de respuesta (concretamente RARE), no solo en el DNA nuclear sino también en la región del DNA mitocondrial conocida como D-loop, sugiere que la vitamina A puede tener un papel esencial en la modulación de la expresión génica mitocondrial (Berdanier, 2001; Bastien y Rochette-Egly, 2004). El receptor RAR también puede formar heterodímeros con el RXR.

Algunos estudios indican que la activación de los receptores de retinoides puede inhibir la proliferación celular, inducir diferenciación celular y apoptosis durante el desarrollo normal de las células del organismo, así como en cultivos de células transformadas (Evans y Kaye, 1999). Sin embargo, el efecto de los retinoides es controvertido ya que existen otros estudios que sugieren que la vitamina A y sus metabolitos son inhibidores de la apoptosis (Semba, 1994; Evarts *et al.*, 1995; Maden *et al.*, 1998) e incluso la deficiencia *in vivo* de vitamina A materna se correlaciona con apoptosis placentaria y malformaciones fetales (Lea *et al.*, 1999).

La activación específica de los receptores RXRs por retinoides está implicada en el control de la sensibilidad a la insulina y de la actividad termogénica del tejido adiposo marrón, lo que relaciona estas moléculas (y parece ser también a todo el grupo de los retinoides) con posibles nuevas drogas en el control de la obesidad (Rial *et al.*, 1999; Martín *et al.*, 2000; Ricquier y Bouillaud, 2000).

Se ha descrito también que los retinoides regulan la expresión de componentes de las MBs y otras proteínas de la MEC, *in vivo* e *in vitro*, aunque sus efectos varían dependiendo del tipo celular y de las condiciones del cultivo. Por ejemplo, se ha visto que el ácido retinoico induce la transcripción del gen que codifica para la cadena  $\alpha 1(\text{IV})$  del colágeno IV en células epiteliales de cristalino de vaca y en células embrionarias de carcinoma F9, aumentando también en este tipo celular la transcripción para la cadena de la laminina  $\beta 1$  (Boylan *et al.*, 1993; Sawhney, 1997). Sin embargo, inhibe la biosíntesis de colágeno IV, laminina y heparán sulfato en células renales en cultivo (Taub, 1991). También se ha encontrado, que el ácido retinoico inhibe la síntesis de colágeno I en lipocitos hepáticos de rata (Sato *et al.*, 1995) así como la de los colágenos I y III en fibroblastos de pulmón humano (Krupsky *et al.*, 1994), mientras que induce la expresión de las cadenas  $\alpha 1(\text{I})$ ,  $\alpha 2(\text{I})$ ,  $\alpha 1(\text{III})$ , propias de los colágenos I y III en condrocitos de embrión de pollo (Dietz *et al.*, 1993) o restablece en piel humana la producción de colágeno I previamente disminuida por efecto de la radiación solar (Griffiths *et al.*, 1993).

Por otra parte, los efectos del ácido retinoico sobre la proliferación y producción de colágeno en un mismo tipo celular quedan fuertemente influenciados por el tipo de MEC con el que las células contactan (Jutley *et al.*, 1993) y se han descrito grandes diferencias, a veces opuestas, en las respuestas a retinoides de los queratinocitos en cultivo e *in vivo* (Fisher y Voorhees, 1996).

#### **4.2.2. Función antioxidante-prooxidante de la vitamina A**

La función antioxidante asignada a la vitamina A es la que provoca mayor controversia, ya que hay datos en contra y a favor. La vitamina A tiene, de hecho, propiedades antioxidantes y prooxidantes. La presión parcial de  $\text{O}_2$  y la concentración de retinoides parecen ser los parámetros críticos en esta disyuntiva. Un aumento de cualquiera de ellos favorece reacciones de prooxidación.

Las propiedades antioxidantes de la vitamina A, conocidas desde hace varias décadas y descritas por primera vez por Monaghan y Schmitt en 1932, han sido reinvestigadas recientemente en sistemas químicos y biológicos. Su naturaleza lipofílica y su localización en el compartimento hidrofóbico de las membranas biológicas y lipoproteínas hacen que

la vitamina A sea un compuesto efectivo en la reducción de la peroxidación lipídica, actuando como inhibidor de las reacciones de oxidación en cadena. Esta propiedad antioxidante es típica del retinol y de sus derivados, aunque sigue un orden decreciente, retinol  $\geq$  retinal  $\gg$  palmitato de retinilo  $>$  ácido retinoico (Livrea y Tesoriere, 1998; Palace *et al.*, 1999).

Distintos estudios afirman que la vitamina A y los retinoides naturales se comportan como antioxidantes en los procesos iniciados por radicales libres. El *all-trans*-retinol, el retinaldehído, el ácido retinoico, el palmitato de retinol y el acetato de retinol son capaces de contrarrestar la producción por NADPH, ascorbato o hierro de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico tanto en preparaciones de membranas, como en homogenados de diversos tejidos de rata como corazón, hígado y sistema nervioso. En relación al sistema nervioso, se ha visto que en él, la vitamina A y sus análogos son muy activos, posiblemente debido al elevado contenido de lípidos poliinsaturados que contiene, y que le hacen susceptible a la peroxidación. Además, experimentos realizados en animales a los cuales se les administra vitamina A, proporcionan datos que indican que los retinoides pueden prevenir la peroxidación *in vivo*, y estudios en humanos administrando dosis pequeñas de vitamina A lo corroboran (Livrea y Tesoriere, 1998).

Las propiedades antioxidantes de la vitamina A, pueden justificarse por varios mecanismos. En primer lugar, su cadena hidrofóbica de unidades poliénicas puede estabilizar los radicales peroxilo y atrapar formas reducidas del oxígeno en la fase lipídica de las membranas y lipoproteínas, donde se encuentran las vitaminas liposolubles. En segundo lugar, la vitamina A puede ser directamente oxidada por radicales libres. La actividad antioxidante no solo se ha demostrado para el retinol sino también para deshidroretinol y muchos carotenoides provitamina A. Numerosos estudios realizados sobre las propiedades antioxidantes de estos compuestos han puesto de manifiesto que aquellos carotenoides con al menos 11 dobles enlaces conjugados ( $\beta$ -caroteno, criptoxantina, luteína, licopeno y zeaxantina) son aproximadamente 5 veces más efectivos que los retinoides como antioxidantes (Tesoriere *et al.*, 1993; Palace *et al.*, 1999).

Sin embargo, como ya se ha comentado, también se ha demostrado la capacidad prooxidante de la vitamina A, siendo esta propiedad la responsable de la toxicidad por aumento en la administración de retinoides y del incremento de la peroxidación lipídica

(Livrea y Tesoriere 1998). Estudios en cultivos celulares, han puesto de manifiesto la importancia de controlar la suplementación de retinoides, ya que concentraciones iguales o superiores a 7  $\mu\text{M}$  de retinol aumentan la peroxidación lipídica y las actividades catalasa y ornitindescarboxilasa. En este mismo sentido, el ácido retinoico es un generador de radicales libres aún más potente que el retinol, concentraciones superiores a 0.1 nM aumentan llamativamente las actividades catalasa, superoxidodismutasa y glutatión peroxidasa, y concentraciones iguales o superiores a 1  $\mu\text{M}$  disparan la peroxidación lipídica (Conte da Frota *et al.*, 2006).

### 4.3. Vitamina A, desarrollo alveolar y función pulmonar

Los retinoides son necesarios para un desarrollo fetal normal en mamíferos, estando involucrados en la formación pulmonar y alveolar durante el periodo neonatal (Cardoso *et al.*, 1995; Chytil, 1996; Massaro y Massaro, 1996; Antipatis *et al.*, 1998; Massaro *et al.*, 2000; Zile, 2001). También juegan un papel imprescindible en el mantenimiento de la arquitectura alveolar una vez formados los alveolos y en la prevención de lesiones pulmonares (Madem y Hind, 2004; McGowan *et al.*, 2004).

Los retinoides han sido relacionados con la alveologénesis. Durante la última etapa de gestación, y coincidiendo con el comienzo de la maduración pulmonar, se produce una rápida descarga de las reservas de ésteres de retinol en los pulmones de los fetos de rata. Esta depleción es el resultado del aumento de la demanda de ácido retinoico durante el desarrollo pulmonar, ya que es requerido de forma inmediata para la diferenciación celular y el metabolismo. Este hecho también es contrastado por los menores niveles de retinol detectados en sangre de niños prematuros, con frecuencia los niveles de vitamina A son dramáticamente bajos en estos niños, especialmente en casos de distrés pulmonar (Shenai *et al.*, 1981; Mupanemunda *et al.*, 1994).

La administración de ácido retinoico durante la etapa postnatal aumenta el número de alveolos durante el desarrollo pulmonar de las ratas, atenúa la inhibición inducida por glucocorticoides durante la alveolarización postnatal (Massaro y Massaro, 1996), aumenta el contenido en colágeno tipo I en la paredes del espacio aéreo y mejora la supervivencia de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia (Veness-Meehan *et al.*, 2000).

De forma similar, estudios en ratas adultas con enfisema inducido por elastasa y crías de rata expuestas a hiperoxia muestran que los retinoides promueven mejoras en la septación alveolar y en la arquitectura pulmonar (Massaro y Massaro, 1997; Massaro *et al.*, 2000; Veness-Meehan *et al.*, 2002).

Hay diversos estudios que han relacionado la vitamina A con los procesos de maduración y regeneración de la traquea y del árbol broncopulmonar, así como con la conservación de la integridad del epitelio pulmonar. Por ejemplo, algunos de estos trabajos sugieren que la regeneración del epitelio traqueal y broncopulmonar, tras una agresión o lesión requiere la proliferación dependiente de vitamina A de células mucociliares. En ratas deficientes en vitamina A la proliferación de estas células está inhibida, lo cual lleva al desarrollo de una traquea metaplásica de células escamosas, y al administrar dieta completa se revierten totalmente estos efectos. De forma que se relacionan directa o indirectamente a los retinoides con el mantenimiento de la morfología pulmonar (Chytil, 1996; Baybutt y Molteni, 2007).

Una ingesta baja de vitamina A aumenta la incidencia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Morabia *et al.*, 1989), y un déficit local o marginal de vitamina A puede ser responsable de alteraciones en la mucosa pulmonar. Dicho déficit tiene como resultado la pérdida de cilios, el aumento de células secretoras y por último la formación de metaplasias escamosas, como ya se ha dicho (Biesalski y Nohr, 2003). Este tipo de alteraciones las sufren sobretodo los fumadores, y producen una reducción del aclarado mucociliar asociado a un aumento de infecciones pulmonares (Donnelly, 1996)

Existen tipos celulares críticos que facilitan y median la reparación pulmonar. El ácido retinoico estimula el crecimiento celular y la proliferación de células de la traquea en cultivo (Lancillotti *et al.*, 1992). En la parte inferior del tracto respiratorio, el mecanismo responsable del mantenimiento de la integridad alveolar, en respuesta a lesiones, es la proliferación de neumocitos tipo II, en gran medida mediada directamente por la vitamina A (Takahashi *et al.*, 1993). Hay estudios que demuestran que los daños producidos por ozono en células pulmonares no son reparados en casos de deficiencia de vitamina A, por estar inhibida la proliferación de estas células (Paquette *et al.*, 1996).

También en humanos, la administración de vitamina A a niños prematuros deficientes en vitamina A reduce la incidencia de displasia broncopulmonar, en la cual se ve perjudicada la formación de septos y disminuye la alveolarización (Shenai *et al.*, 1987; McMenemy y Zachman, 1993). Evidencias obtenidas en estudios de laboratorio, sugieren que los retinoides pueden tener un efecto protector sobre el estatus respiratorio en pacientes con fibrosis quística (Aird *et al.*, 2006), y una aplicación potencial en la prevención y tratamiento del enfisema pulmonar, ya que se ha demostrado que el tratamiento con ácido retinoico inicia y potencia la septación y la formación de alveolos más pequeños y numerosos (Massaro y Massaro, 2002; Baybutt y Molteni, 2007).

#### **4.4. Deficiencia de vitamina A**

La concentración plasmática fisiológica de vitamina A es 1-2  $\mu\text{M}$ , y guarda una estrecha relación con sus niveles hepáticos, ya que existen mecanismos homeostáticos muy sensibles que regulan la liberación de retinol desde su lugar de almacenamiento en el hígado (Pitt, 1981). Concentraciones inferiores a 0.7  $\mu\text{M}$  son consideradas por la Organización Mundial de la Salud como indicativo de deficiencia de vitamina A (Sommer, 1995; Underwood, 2004).

Estudios epidemiológicos indican que la deficiencia de vitamina A es actualmente, junto a la desnutrición proteica, el trastorno nutricional más grave y común en el mundo, afectando clínicamente a más de 5 millones de personas al año. Incluso las formas subclínicas asintomáticas de deficiencia aumentan la morbilidad y mortalidad de gran variedad de infecciones, y de forma particular, aumenta la incidencia y morbilidad de enfermedades del tracto respiratorio (Sommer *et al.*, 2001; West, 2003; Underwood, 2004).

##### **4.4.1. Etiología**

En la última década se ha realizado un gran esfuerzo a nivel mundial para controlar la deficiencia de vitamina A y las enfermedades relacionadas, pero la deficiencia de vitamina A sigue siendo un problema importante de salud pública, afectando sobretodo a la población infantil de países en vías de desarrollo. En algunos países la deficiencia

alcanza a un porcentaje muy elevado de niños, incluso al 90%, convirtiéndose en una de las causas más habituales de mortalidad infantil.

La ingesta de vitamina A, según estudios de la OMS, es baja en los países del Este, media en Latinoamérica y África, y más alta en Europa y Norte América comparativamente. Es importante resaltar que más del 20% de la población de los países desarrollados no alcanza los 2/3 de la ingesta recomendada de vitamina A, presentando concentraciones plasmáticas o hepáticas inferiores a los límites aceptados como normales. Esta situación puede verse agravada por la tendencia actual a disminuir el contenido en grasa de la ingesta (Bendich y Langseth, 1989; West *et al.*, 1989; Underwood y Arthur, 1996; Underwood *et al.*, 2004), así como por los regímenes incontrolados de pérdida de peso. En este entorno, la mayor prevalencia aparece en mujeres embarazadas de clase social baja, y en adultos y niños afectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el cual, según muestran diferentes trabajos, provoca deficiencia de vitamina A y, recíprocamente, esta deficiencia es un factor común en la transmisión y progresión del HIV (Cox, 1999; Semba y Tang, 1999). En este sentido, estudios recientes avalan la hipótesis de que los retinoides son represores naturales del HIV *in vivo* (Hanley *et al.*, 2004).

La ingesta crónica de alcohol también predispone a una deficiencia de vitamina A (Lieber, 2000). A pesar de la malnutrición que viene asociada al alcoholismo, y posible causa de deficiencia, existen estudios que relacionan directamente el alcohol con la depleción de vitamina A. Se han postulado dos posibles mecanismos que los explican, un aumento en la movilización de los depósitos de ésteres de retinol hepáticos y/o un aumento del catabolismo de vitamina A en el hígado y otros tejidos. Además, el alcohol bloquea la ruptura de la molécula de  $\beta$ -caroteno reduciendo la obtención de retinol por la alimentación.

Otras causas de deficiencia de vitamina A son estrés, malabsorción de grasas, traumatismos e infecciones (WHO, 1998).

#### 4.4.2. Patologías relacionadas con la deficiencia de vitamina A

Aquellos problemas de salud atribuibles a la deficiencia de vitamina A se denominan de forma general desordenes de deficiencia de vitamina A o VADD. La hipovitaminosis A afecta a gran número de tejidos, provocando desde manifestaciones oculares como la xeroftalmia, incluyendo la ceguera como secuela, hasta alteraciones menos específicas como retraso en el crecimiento, mayor susceptibilidad a infecciones, o incluso muerte (West, 2003).

*Xeroftalmia.* Los trastornos producidos por la deficiencia de vitamina A a nivel de la visión son bien conocidos, incluso a nivel molecular. La vitamina A es un factor crucial para el mantenimiento de la integridad de la conjuntiva y de la córnea, ya que regula la producción de mucina en el epitelio ocular, sustancia muy importante para su defensa (Heinz *et al.*, 2004). La ceguera nocturna es una de las primeras manifestaciones de deficiencia en vitamina A, que también puede originar xerosis y keratomalacia. Es importante el diagnóstico temprano, ya que si bien las primeras alteraciones oculares originadas por esta deficiencia son reversibles, las lesiones tardías producen daño permanente en la córnea y pérdida de la visión (Bennet *et al.*, 2004).

*Sistema Inmunitario.* La deficiencia de vitamina A aumenta la susceptibilidad a infecciones, lo que a su vez puede agravar aún más los estados de deficiencia. Existen diversos estudios que demuestran que la deficiencia de vitamina A provoca alteraciones en la producción de anticuerpos y, en consecuencia, una respuesta frente a antígenos alterada. También se ha descrito que produce cambios en el sistema linfóide y en la maduración de linfocitos, una producción anormal de los reguladores de la respuesta inmune, así como disminución de la actividad de las células NK y alteración en las funciones fagocíticas y citotóxicas. Todas estas alteraciones aumentan el riesgo de muerte por enfermedades infantiles comunes como la diarrea, sarampión o infecciones respiratorias agudas. Mientras que la suplementación de vitamina A aumenta rápidamente los niveles de IgG y linfocitos-T (Ross y Stephensen, 1996; Stephensen, 2001).

En un estado de deficiencia de vitamina A la integridad física y biológica de los tejidos epiteliales se ve comprometida y, por tanto, la primera barrera frente a infecciones. Esto se traduce en la aparición de alteraciones, como por ejemplo metaplasia escamosa

con pérdida de cilios y queratinización de algunos tramos del epitelio respiratorio, propiciándose un mayor contacto con agentes infecciosos y una disminución de la resistencia a las infecciones relacionadas con el sistema respiratorio (Chytil, 1996; Baybutt y Molteni, 2007).

La deficiencia de vitamina A se describe como un factor que estimula la respuesta inflamatoria aguda, provocando la activación de macrófagos y la producción descontrolada de citoquinas proinflamatorias que conducen a cambios metabólicos como consecuencia del proceso inflamatorio (Harbige, 1996; Moldawer y Copeland, 1997). Por ejemplo, se ha demostrado que la deficiencia en vitamina A produce inflamación acompañada de deposición de colágeno en un modelo experimental de colitis inducida, mientras que una suplementación con esta vitamina disminuye el efecto inflamatorio (Reifen *et al.*, 2002).

*Otros.* También se han relacionado otros procesos patológicos con la deficiencia en vitamina A, como fibrosis hepática, embriotoxicidad, hepatotoxicidad y carcinogénesis. Curiosamente, algunos de estos procesos también aparecen en los casos de utilización de dosis suprafiológicas de vitamina A y/o carotenos, como es el aumento en la incidencia de cáncer de pulmón en fumadores suplementados con  $\beta$ -caroteno.

En el caso de los pulmones, la deficiencia de vitamina A se ha relacionado con el enfisema. Varios estudios en ratas alimentadas con dieta carente de vitamina A, mostraron una disminución en el número de alveolos causada por la aparición de espacios aéreos mas grandes, y perdida de tejido pulmonar por volumen de órgano. Además, también se identificaron zonas de neumonitis intersticial, reducción de la producción de surfactante por parte de los neumocitos tipo II e incremento de las deposiciones de colágeno (Buybutt *et al.*, 2000; Maden y Hind, 2004; Buybutt y Molteni, 2007).

Recientemente se ha descubierto que la deficiencia de vitamina A altera la estructura y composición de la MEC renal, y en especial de la MB glomerular y tubular. La deficiencia nutricional de vitamina A produce un engrosamiento anormal de las MBs renales y una variación en el contenido de colágeno IV de las mismas, así como de las cadenas que lo forman y de las metaloproteasas de matriz 2 y 9 (Marín *et al.*, 2005).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### 1. Hipótesis

Los estudios realizados hasta el momento, han mostrado que la composición y la estructura de la MB influyen profundamente en la biología de las células, y modulan la respuesta celular frente a agentes reguladores del crecimiento, diferenciación y metabolismo, como son los factores de crecimiento, las hormonas o las vitaminas. Es por esto que las bases de nuestro trabajo se centran en la influencia recíproca que tienen las MBs y los reguladores del comportamiento celular, como los retinoides, y cuyos desequilibrios pensamos son críticos en el inicio y progreso de diferentes enfermedades.

La MB forma una estructura continua a través de todo el pulmón, y desempeña funciones de gran importancia en la fisiología y patología pulmonar, como la diferenciación de neumocitos, la comunicación intercelular entre las células epiteliales alveolares, la señalización proapoptótica o de supervivencia para las células endoteliales, y la regulación de la formación de uniones gap. Además, una gran parte de las alteraciones de la función y arquitectura pulmonar se asocian a cambios en el contenido proteico de la MEC y en su distribución.

La contribución de la vitamina A en Salud Pública es incuestionable y va más allá de su importancia en la prevención de problemas oculares y ceguera. Los retinoides son un grupo de moléculas químicamente relacionadas con la vitamina A, de origen natural o sintético, que son indispensables, por ejemplo, para el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la arquitectura tisular. En este sentido, se sabe que el ácido retinoico modula la expresión de diversas proteínas de la MEC, a través de receptores nucleares específicos de forma directa, actuando sobre sus promotores, o indirecta, modificando la expresión de otros factores profibróticos. Además, no hay que olvidar la importancia de los retinoides como potentes antioxidantes que ayudan a mantener el estado redox de las células.

En consecuencia, la hipótesis de trabajo de nuestro grupo se basa en que la deficiencia de vitamina A, debido principalmente a la ausencia de uno de sus metabolitos más importantes, el ácido retinoico, puede afectar a la síntesis de las moléculas que componen las MBs e inducir cambios en su composición y estructura. Estos cambios tendrían como resultado la aparición de alteraciones en el desarrollo y la función de los órganos, y desencadenarían trastornos patológicos.

## 2. Objetivos

Con este trabajo se pretende obtener un mayor conocimiento, a nivel molecular, de los efectos de la deficiencia de vitamina A sobre la estructura y composición de la MB, cuyas alteraciones pueden ser mediadoras o responsables de las diferentes manifestaciones patológicas de esta deficiencia. Los principales objetivos del mismo son los siguientes:

1. Analizar los cambios producidos en la estructura de la MB de pulmón de ratas sometidas a una dieta deficiente en vitamina A.
2. Valorar los cambios en la composición de la MB, cuantificando el colágeno IV y la laminina en muestras de pulmón de dichos animales, así como las distintas cadenas que los componen.
3. Medir los niveles de mRNA para cada una de las cadenas  $\alpha$  que constituyen la estructura del colágeno IV, y las cadenas de laminina mayoritarias. El análisis combinado de estos resultados con los del objetivo anterior, nos proporcionará una aproximación al origen transcripcional y/o traduccional de los cambios observados.
4. Estudiar el contenido en colágenos de la MEC pulmonar.
5. Cuantificar las colagenasas MMP2 y MMP9, así como sus inhibidores TIMP1 y TIMP2, y analizar los posibles cambios producidos en la actividad de las mismas.
6. Valorar el estrés oxidativo y marcadores de inflamación en los pulmones de los diferentes grupos de ratas, con el fin de conocer los posibles desencadenantes de las alteraciones.
7. Estudiar la reversibilidad de las alteraciones al tratar los animales deficientes en vitamina A con ácido retinoico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## MATERIALES

### 1. Productos y reactivos

Los productos y reactivos químicos utilizados en este trabajo fueron de grado de pureza analítica y se obtuvieron principalmente de Sigma Chemical (St. Louis, Missouri, USA), Bio-Rad (California, USA), Boehringer Mannheim (Alemania), Panreac (España) y Merk (Darmstadt, Germany).

Las membranas de PVDF modelo Immun-Blot™ (0.2 μm) se adquirieron de Bio-Rad (California, USA).

Los marcadores de peso molecular se adquirieron de Bio-Rad (California, USA).

Se utilizaron anticuerpos específicos cedidos en algunos casos por los laboratorios que los habían desarrollado, y otros comercialmente disponibles (ver tabla 6 en métodos).

Los anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina o peroxidasa, fueron suministrados por distintas casas comerciales (ver tabla 6 en métodos). Y el anticuerpo conjugado con oro coloidal con partículas de oro de 10 nm fue suministrado por Sigma Chemical.

La dieta suministrada a los animales de experimentación fue adquirida de ICN-Biomedicals (ICN-Biomedical, Cleveland, Ohio, USA).

El pentotal sódico fue obtenido de laboratorios Abott.

### 2. Aparatos e instrumental

#### 2.1. Microscopio electrónico

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Philips modelo CM-100.

## **2.2. Ultramicrotomos**

Se emplearon los ultramicrotomos Ultracut Reichert Jung y LKB Bromma modelo 8800 Ultratome III.

## **2.3. Microscopio óptico**

Se utilizó el microscopio óptico Olympus modelo BX50.

## **2.4. Aparatos ópticos**

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron con los espectrofotómetros de doble haz Shimadzu UV-160 e Hitachi U2000.

También se utilizó el lector de placas de LabSystems, Multiskan MS versión 8.0.

## **2.5. Aparatos de electroforesis y transferencia**

Las electroforesis en minigeles de poliacrilamida se realizaron en las minicélulas de Bio-Rad, modelo Mini Proteam II.

Cuando los geles fueron de agarosa, se utilizó la célula de C.B.S. Scientific CO. Modelo MGV-200T.

Los equipos de transferencia a papel de PVDF los suministró Bio-Rad, modelo Mini Proteam II.

Las fuentes de alimentación empleadas fueron de Bio-Rad modelo 1000/500 ó de Power/Pac modelo 300.

## 2.6. Centrífugas

Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en las centrífugas Microcentrífuga microspin 24 de Sorvall Instruments, Sorvall modelo MC 12V, Eppendorf modelo 5415D y las centrifugas refrigeradas Haraeus, modelos Labofuge 200 y Labofuge 400R. Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en la centrífuga Haraeus Instrument Biofuge 13 y en la ultracentrífuga Beckman Coulter, Optima™ Max.

## 2.7. Incubadores

Se utilizaron dos modelos, el incubador termostatzado orbital Infors AG modelo CH-4103, y el incubador de New Brunswick Scientific modelo C25 incubator shaker.

## 2.8. Sonicador

Se utilizó un sonicador Branson modelo 1510.

## 2.9. Analizador de RNA y Termocicladores

El analizador de RNA utilizado fue el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies USA).

El termociclador utilizado para obtener el cDNA fue el Mastercycler 5333 (Eppendorf) y para los estándares fue el GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

El termociclador en tiempo real utilizado fue el modelo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

## 2.10. HPLC

El sistema de HPLC utilizado estaba constituido por dos bombas Waters modelo 515, inyector manual Waters modelo 2157, detector de fotodiodos Waters 996 modelo

441 y columna Nova-Pack C-18 suministrada por Waters. Como sistema computerizado para el procesamiento de datos se utilizó el Millennium<sup>32</sup> Chromatography Manager.

### 2.11. Otros

También se utilizaron: rejillas filmadas de cobre y níquel, película fotográfica Scientia EM film de Agfa, filtros Millipore, cámaras de extracción de gases, pH-metro Crison, modelo micropH 2002, baños termostatzados con y sin agitación Heto, BBD digital block heater de Grant Boekel, desecador de placas Edwards modelo Plate Degasser PD3, estufas Memmert y Selecta modelo 203, balanzas modelos Mettler P120 y Sauter GmbH D-7470, autoclaves, agitadores, vortex atomoxe-Atom, micropipetas automáticas Gilson de volumen regulable, homogeneizador tipo Potter-Elvehjem RW, 20DMZ Janke & Kunker (Ika-Werk), émbolos de teflón de diferentes diámetros, arcones a -20 °C y -80 °C para almacenamiento de muestras, jeringas Hamilton de diversas capacidades, material de vidrio usual en todo laboratorio, material de plástico desechable, material quirúrgico etc..

## 3. Animales de experimentación

Los animales fueron cuidados y tratados de acuerdo con los criterios establecidos en la "Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio", realizada por la National Academy of Sciences y publicada por el National Institute of Health (National Research Council, 1995).

Para la realización del presente trabajo se utilizaron ratas macho de la raza Wistar que se dividieron en dos grupos experimentales: animales control (concentración aproximada de retinol en plasma 1.6  $\mu\text{M}$ ), y animales deficientes en vitamina A (concentración de retinol en plasma  $< 0.7 \mu\text{M}$ ). Este último grupo se subdividió en tres al llegar a los 60 días de vida: el grupo VAD que se sacrificó junto con los controles, el grupo RR que se suplementó intraperitonealmente con ácido retinónico en aceite de girasol durante 10 días, y el grupo tratado con vehículo al que se le inyectó durante 10 días aceite de girasol únicamente. Los animales VAD, RR y tratados con vehículo, se

consiguieron mediante la administración de una dieta exenta de vitamina A, tal como se detalla a continuación en la sección de Métodos.

#### 4. Dietas AIN-93G

La dieta representa el factor más importante en nutrición experimental (Reeves, 1997). Los distintos tipos manufacturados de dieta animal son: dietas no purificadas (proviene de fuentes naturales mixtas), dietas purificadas (proviene de ingredientes refinados, por ejemplo proteínas aisladas tipo caseína) o dietas químicamente definidas (elaboradas con ingredientes químicamente puros, como serían aminoácidos aislados). En nutrición experimental animal las dietas más utilizadas y recomendables son las purificadas o las definidas químicamente, ya que el conocimiento y el control preciso de los componentes de la dieta es imprescindible para el establecimiento del mecanismo particular de un nutriente.

Componentes de la dieta	g / Kg de dieta
Almidón de maíz	397.5
Caseína (exenta de vitaminas)	200.0
Dextrina de maíz	132.0
Sacarosa	100.0
Aceite de soja	70.0
Celulosa	50.0
Mezcla de minerales AIN-93G-MX *	35.0
Mezcla de vitaminas AIN-93G-VX **	10.0
L-cisteína	3.0
Bitartrato de colina	2.5
terc-butil hidroquinona	0.014

**Tabla 3.** Composición de la dieta AIN-93G.

En 1977 y 1980 el American Institute of Nutrition (AIN) publicó la formulación de una dieta purificada para roedores que designó como AIN-76A, cumpliendo o incluso sobrepasando los requerimientos nutricionales dados por el National Research Council (National Academy of Sciences, 1978). En 1993, tras numerosos estudios, la formulación fue revisada y actualizada a la hoy conocida como AIN-93G y AIN 93M, con una mejora del balance de nutrientes esenciales para estudios en experimentación animal a corto y largo plazo (Reeves *et al.*, 1993; National Research Council 1995; Reeves, 1997). La dieta AIN-93 G está formulada específicamente para el crecimiento, embarazo y lactancia de roedores. A continuación se describe la composición específica de la dieta sólida AIN-93G utilizada en la alimentación de los animales control. Los animales de los grupos deficiente y recuperado con ácido retinoico fueron alimentados con la misma dieta pero exenta de vitamina A.

* Mezcla de minerales AIN-93G-MX	Composición por Kg de mezcla
Carbonato cálcico anhidro	357.00 g
Fosfato potásico monobásico	196.00 g
Citrato potásico (tripotásico, monohidratado)	70.78 g
Cloruro sódico	74.00 g
Sulfato potásico	46.60 g
Óxido de magnesio	24.00 g
Citrato férrico	6.06 g
Carbonato de zinc	1.65 g
Meta-silicato sódico. 9 H <sub>2</sub> O	1.45 g
Carbonato de manganeso	0.63 g
Carbonato cúprico	0.30 g
Sulfato de cromo y potasio. 12 H <sub>2</sub> O	0.28 g
Ácido bórico	81.50 mg
Fluoruro de sodio	63.50 mg
Carbonato de níquel	31.80 mg
Cloruro de litio	17.40 mg
Selenato de sodio anhidro	10.25 mg
Yodato potásico	10.00 mg
Paramolibdato amónico. 4 H <sub>2</sub> O	7.95 mg
Vanadato amónico	6.60 mg
Sacarosa en polvo	221.02 g

**Tabla 4.** Composición de la mezcla de minerales AIN-93G.

<b>** Mezcla de vitaminas AIN-93G-VX</b>	<b>Composición por Kg de mezcla</b>
Ninacina	3.00 g
Pantotenato cálcico	1.60 g
Piridoxina HCl	0.70 g
Tiamina HCl	0.60 g
Riboflavina	0.60 g
Ácido fólico	0.20 g
Biotina	0.02 g
Vitamina B <sub>12</sub>	2.50 g
$\alpha$ -Tocoferol (250 U/g)	30.00 g
Palmitato de retinol (250.000 U/g)	1.60 g
Vitamina D <sub>3</sub> (400.000 U/g)	0.25 g
Menadiona	0.08 g
Sacarosa en polvo	958.85 g

**Tabla 5.** Composición de la mezcla de vitaminas AIN-93G.

## MÉTODOS

### 1. Tratamiento dietético de los animales

La deficiencia en vitamina A se consiguió mediante la administración a los animales de experimentación de una dieta exenta de dicha vitamina, como se describe a continuación. Hembras gestantes con control sanitario suministradas por Charles River (Barcelona), se dividieron en dos grupos, control y deficiente en vitamina A (VAD), y se alojaron en jaulas individuales, colocadas en una habitación aislada, mantenida a una temperatura entre 22-25 °C con humedad constante, y un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. El día después del parto, las madres del grupo control pasaron a ser alimentadas con una dieta completa suministrada por ICN [AIN-93G (ver tabla 3 en materiales) siguiendo las recomendaciones dadas por el American Institute of Nutrition (Reeves *et al.*, 1993)]. Las madres del grupo VAD fueron alimentadas con la misma dieta que el grupo control con la salvedad de que la mezcla de vitaminas carecía de vitamina A.

La alimentación de las madres con dieta VAD durante el periodo de lactancia reduce el aporte de esta vitamina en la leche materna y acorta el periodo de inducción de deficiencia de vitamina A en las crías (Pasatiempo *et al.*, 1991). Sin embargo, no modifica la producción de leche materna ni el crecimiento normal de las crías.

Tras el periodo de lactancia (21 días), las crías macho pasaron a ser alimentadas con la misma dieta que sus correspondientes madres, continuando hasta que cumplieron 60 días de vida. Este periodo fue apropiado para inducir una severa deficiencia en vitamina A, sin alterar significativamente el crecimiento de los animales (Estornell *et al.*, 2000). La alimentación con este tipo de dieta por periodos superiores al elegido, puede provocar una disminución en la ingesta, una estabilización del crecimiento y la muerte prematura de los animales. En este momento el grupo VAD se subdividió en tres grupos: el grupo VAD propiamente dicho, sacrificado junto con los controles ese mismo día (Barber *et al.*, 2000); el grupo RR, que se trató diariamente con inyecciones intraperitoneales de ácido *all-trans*-retinónico (100 µg en 100 µl de aceite de girasol) durante 10 días; y el grupo tratado con vehículo, al que se le inyectó diariamente 100 µl de aceite de girasol durante

ese mismo periodo, para comprobar que este aceite no ejercía ningún efecto sobre la deficiencia de vitamina A.

Durante el estudio, las dietas se prepararon diariamente proporcionándose cantidades equivalentes de la dieta correspondiente a cada grupo, siendo el acceso al agua totalmente libre.

## 2. Obtención de muestras biológicas

Los animales fueron anestesiados con pentotal sódico (50 mg/kg peso, vía intraperitoneal). Las muestras de sangre se obtuvieron por punción en la aorta abdominal utilizando jeringuillas heparinizadas, a continuación se extrajeron rápidamente los pulmones y se lavaron con suero fisiológico, se pesaron y se congelaron por presión entre dos pinzas de aluminio previamente enfriadas en nitrógeno líquido (técnica de freeze-clamping, Wolleberger *et al.*, 1960). Finalmente se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesado. De esta forma la delgada capa de tejido se congela en fracciones de segundo.

Con los animales destinados al estudio mediante microscopía electrónica se siguió otro tipo de tratamiento. Tras anestesiarlos, se perfundieron a través de la arteria carótida, con una disolución fijadora de 4% de paraformaldehído (16% grado ME) y 0.5% de glutaraldehído (25% grado ME) en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.4. La velocidad de perfusión fue inicialmente de 25 ml/min durante 2 minutos, para disminuir después a 4 ml/min durante 13 minutos. La perfusión con el fijador se realizó con el fin de garantizar una mejor preservación de los tejidos.

Tras la perfusión se extrajeron los pulmones, y se trocearon en fragmentos de 1-2 mm de ancho. Dichos fragmentos se dividieron en dos partes equivalentes, la primera para el estudio ultraestructural, y la segunda para la realización de análisis inmunocitoquímicos.

### 3. Medida de Retinoides

La concentración de retinoides, retinol plasmático (forma mayoritaria de transporte de vitamina A), retinol pulmonar y palmitato de retinol pulmonar (forma mayoritaria de almacenaje de vitamina A) fue determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para la extracción del retinol y otras vitaminas liposolubles presentes en el plasma y en el pulmón se siguieron los métodos basados en la extracción en fase hexánica de las mismas, descrito por Arnaud *et al.*, (1991) para el plasma y por Podda *et al.*, (1999) para el pulmón.

En ambos casos, plasma y pulmón, la determinación de la cantidad de retinoides presentes fue llevada a cabo siguiendo las condiciones cromatográficas indicadas en el método de Arnaud *et al.*, (1991).

Durante todo el proceso los tubos se mantuvieron a 4 °C y protegidos de la luz.

#### 3.1. Extracción de retinoides

*Retinol Plásmatico.* Las muestras de sangre se protegieron de la luz y se centrifugaron, inmediatamente después de ser extraídas, a 2000 g durante 10 minutos, para separar el plasma. Una vez obtenido el plasma, 100 µl del mismo fueron mezclados con idéntico volumen de etanol al 100% y con 250 µl de hexano. La mezcla fue agitada durante 2 minutos tras lo que se centrifugó a 700 g durante 5 minutos. Posteriormente, 125 µl de la fase hexánica se transfirieron a otro tubo y se evaporaron a sequedad en atmósfera de nitrógeno. El residuo resultante se disolvió en 100 µl de acetonitrilo:diclorometano:metanol (70:20:10) mediante agitación durante 2 minutos, y se tomaron alícuotas de 20 µl para inyectarlas en una columna cromatográfica.

*Retinoides pulmonares.* Con el fin de evaluar las diferencias en los niveles de retinoides en el pulmón de los distintos grupos de experimentación, se pesaron 50 mg de pulmón de cada muestra a analizar y se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem con 2 ml de PBS, frío y sometido a atmósfera de nitrógeno, que contenía 50 µl de Butilhidroxitolueno (BHT) (1

mg/ml), durante 1 minuto. El homogenado se recogió en un tubo y se le añadió 1 ml de SDS (0.1 mM). La mezcla fue agitada 30 segundos, sonicada 15 segundos, y enfriada en hielo 15 segundos más, para de nuevo agitarla 15 segundos. Seguidamente se añadieron 2 ml de etanol, frío y sometido a atmósfera inerte de nitrógeno, y se repitió el proceso anterior. Finalmente tras añadir 2 ml de hexano y agitar durante 2 minutos, la mezcla fue centrifugada a 1000 g por un periodo de 5 minutos a 4 °C. Se transfirieron 1.75 ml de la fase hexánica a un nuevo tubo y se evaporaron a sequedad en atmósfera de nitrógeno, disolviendo el residuo resultante en 150  $\mu$ l de una mezcla de acetonitrilo:diclorometano:metanol (70:20:10), siguiendo los pasos de agitación y sonicación descritos arriba. Posteriormente alícuotas de 40  $\mu$ l fueron inyectadas en una columna cromatográfica.

### 3.2. Condiciones del método de HPLC

Teniendo una visión de la absorbancia a tiempo real en un rango de 200-550 nm, se marcó en el PhotoDiode Array (PDA) una  $\lambda$  de 325 nm, para la determinación de los retinoides. Se utilizó una columna Nova Pack C-18 (3.9 x 150 mm, Waters) de fase reversa. La fase móvil utilizada consistió en acetonitrilo:diclorometano:metanol, en proporción 70:20:10. El flujo establecido fue de 1 ml/minuto y se aplicó durante 15 minutos. En estas condiciones el retinol sale inmediatamente después del frente a un tiempo de retención de 2 minutos, y el palmitato de retinol sale a un tiempo de retención de 8 minutos.

Todos los reactivos utilizados en este ensayo fueron de grado HPLC.

## 4. Determinación de factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ) e interleuquina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Para la cuantificación de estos marcadores de inflamación se utilizaron kits comerciales de ELISA para cada una de la proteínas. Las muestras se prepararon del siguiente modo, se tomaron fragmentos de 0.1 g de pulmón perteneciente a animales de los grupos control, VAD y RR, que se homogeneizaron en 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, que contenía 0.1% de triton X-100 y 5  $\mu$ l de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P-8340). El homogenado resultante fue sonicado 2 veces durante 30

segundos en frío, para después ser centrifugado a 450000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se destinaron a analizar los contenidos de TNF- $\alpha$ , de IL-1 $\alpha$ , de IL-1 $\beta$ , de TGF- $\beta$ 1, de la actividad mieloperoxidasa y de peroxidación lipídica. Todo el proceso se realizó a 4 °C, y las muestras se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Los ensayos de ELISA se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante (Biolink 2000). Brevemente, se añadieron a los pocillos, previamente recubiertos con anticuerpos monoclonales para cada proteína, 50  $\mu$ l de cada muestra a 50  $\mu$ l de tampón de ensayo y a 50  $\mu$ l del anticuerpo biotilado, incubándose durante 2 horas. Pasado el periodo de incubación, los pocillos se lavaron y se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución de Streptavidina-HRP incubándose durante 1 hora más. Tras ello, se volvieron a lavar los pocillos y se añadieron 100  $\mu$ l de la disolución sustrato, realizando la reacción en oscuridad hasta que se desarrolló el color, en 15 minutos. Finalmente se procedió a medir la absorbancia a una  $\lambda$  de 450 nm. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente.

## 5. Determinación de actividad mieloperoxidasa

La determinación de actividad mieloperoxidasa se realizó mediante registro continuo del incremento de absorbancia producido por la oxidación de la orto-dianisidina (Dewald y Baggiolini, 1986). Brevemente, las muestras utilizadas se prepararon según se detalla en el apartado 4 de Métodos. A 10  $\mu$ l de cada muestra (previamente diluidas en tampón citrato-fosfato en proporción 1:10 ó 1:20) se le añadieron 990  $\mu$ l del reactivo de trabajo, y se midió el incremento de absorbancia durante 1 minuto a una  $\lambda$  de 450 nm. Adicionalmente, los ensayos también se realizaron en presencia de NaN<sub>3</sub> 40 mM, produciéndose una inhibición total en la aparición de producto, indicando exclusivamente una valoración de actividad peroxidasa. La actividad se expresó en unidades arbitrarias, definidas como la cantidad de enzima que produce un  $\Delta A_{450}$  de 0.001/min.

Como reactivo de trabajo se utilizó una disolución constituida por 10 ml de tampón citrato-fosfato (citrato 0.05 M, fosfato 0.01 M) pH 5.0, al que se añadieron 100  $\mu$ l de o-dianisidina (10 mg/ml) y 5  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 30%.

## 6. Determinación del factor de crecimiento $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ) en pulmón

El TGF- $\beta_1$  se determinó por ELISA siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega). Brevemente, se añadieron a los pocillos, previamente recubiertos con anticuerpos monoclonales frente a TGF- $\beta_1$ , 100  $\mu$ l de cada muestra diluida 1:4 y se incubó durante 90 minutos. Entonces los pocillos se lavaron y se añadió 100  $\mu$ l de anticuerpo policlonal frente a TGF- $\beta_1$ , incubándose durante 2 horas. Pasado el periodo de incubación, los pocillos se lavaron y se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución de anticuerpo anticonejo-HRP incubándose durante 2 horas más. Tras ello, se volvieron a lavar los pocillos y se añadieron 100  $\mu$ l de la disolución sustrato, realizando la reacción en oscuridad hasta que se desarrolló el color, en 15 minutos. Finalmente se procedió a medir la absorbancia a una  $\lambda$  de 450 nm.

Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente.

## 7. Valoración del estrés oxidativo. Niveles de malondialdehído

La acción de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, provocando su peroxidación y produciéndose pérdida de la flexibilidad de la membrana y de las funciones secretoras, así como ruptura de los gradientes iónicos transmembrana. Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, siendo el mayoritario de ellos el malondialdehído.

Para la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) utilizamos un método de HPLC, descrito por Wong *et al.*, (1987). Este método se basa en la hidrólisis ácida de los lipoperóxidos presentes en el plasma o mitocondrias, con ácido ortofosfórico diluido, a una temperatura de 100 °C. La reacción del MDA, producto mayoritario de la hidrólisis ácida de los lipoperóxidos, con el ácido tiobarbitúrico (TBA) nos permitió cuantificar los aductos [MDA-TBA<sub>2</sub>], a una  $\lambda$  de 532 nm.

Se utilizaron los sobrenadantes de los homogenados de las muestras, obtenidos tal y como se detalla en el apartado 4 de Métodos. Preparamos la mezcla de reacción con:

750  $\mu\text{l}$  de ácido ortofosfórico 0.44 M, 250  $\mu\text{l}$  de TBA (6 mg/ml), 450  $\mu\text{l}$  de agua y 50  $\mu\text{l}$  de homogenado de pulmón. Posteriormente la mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 1 hora, y se dejó enfriar en hielo. A continuación se neutralizaron a partes iguales la mezcla de reacción con una disolución compuesta por 4.5 ml de metanol y 0.5 ml de NaOH 3 M, se agitó y se centrifugó a 15000 g a 4 °C, durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y se inyectaron en el cromatógrafo 50  $\mu\text{l}$  antes de que transcurrieran 10 minutos desde la neutralización de la muestra, porque a pH neutro el aducto [MDA-TBA<sub>2</sub>] es inestable.

Teniendo una visión de la absorbancia a tiempo real en un rango de 200-550 nm, se marcó en el PhotoDiode Array (PDA) una  $\lambda$  de 532 nm, para la determinación de los del aducto [MDA-TBA<sub>2</sub>]. Se utilizó una columna Nova Pack C-18 (3.9 x 150 mm, Waters) de fase reversa. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM pH 6.8 y acetonitrilo en proporción 85:15. El flujo establecido fue de 1 ml/minuto. En estas condiciones el tiempo de retención del MDA es de 3 minutos.

Todos los reactivos utilizados en este ensayo fueron de grado HPLC.

## 8. Preparación de membrana basal de pulmón

Para los estudios de la composición proteica de la MB pulmonar se tomaron 0.1 g de pulmón perteneciente a animales de los grupos control VAD y RR, y se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem, en 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, que contenía 0.25% de triton X-100, así como un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P-8340). Tras centrifugar durante 10 minutos a 450000 g a 4 °C y recoger el sobrenadante, al sedimento restante se le añadió 1 ml del mismo tampón de homogeneización y se sonicó, dos pulsos de 15 segundos a 11 mA con un intervalo de 30 segundos para enfriar las muestras. Seguidamente se centrifugó durante 10 minutos a 450000 g a 4 °C, y el sobrenadante se mezcló con el anteriormente obtenido, reservando el sedimento para su digestión con colagenasa. Los sobrenadantes se congelaron a -20 °C hasta su utilización para la determinación de MMPs y TIMPs.

## 9. Digestión con colagenasa bacteriana

Los sedimentos obtenidos se lavaron dos veces con el tampón hepes 50 mM pH 7.5, que contenía inhibidores de proteasas (Sigma P-8340) y  $\text{NaN}_3$  0.05%. El sedimento se resuspendió en 800  $\mu\text{l}$  del siguiente tampón: hepes 50 mM pH 7.5,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, inhibidores de proteasas (Sigma P8340) y  $\text{NaN}_3$  0.05%, y se le añadieron 25  $\mu\text{l}$  de colagenasa bacteriana (10 mg/ml, 7500 U/ml) (Sigma C-7521). La mezcla se incubó durante 48 horas a 37 °C en agitación. Transcurrido ese tiempo, los tubos se centrifugaron 15 minutos a 15000 g.

Este procedimiento se repitió dos veces para comprobar que la extracción era completa, con la salvedad de que los sedimentos resultantes se dispersaron ajustando las cantidades de tampón y colagenasa a un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ .

Al material solubilizado se le añadió EDTA hasta una concentración final de 25 mM, y se guardó a -80 °C hasta su utilización.

## 10. Determinación de Hidroxiprolina

La cuantificación de hidroxiprolina se realizó según el método de Huszar (Huszar *et al.*, 1980) tal y como se describe a continuación.

Dos alícuotas de cada muestra se introdujeron en tubos de pirex de 6 ml y se mantuvieron en estufa a 100 °C durante 20 minutos aproximadamente, hasta su completa evaporación. El material fue entonces hidrolizado autoclavándolo a 121 °C durante 10 minutos con 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 4 M. Después de neutralizar las muestras con 50  $\mu\text{l}$  de una disolución de ácido cítrico 1.4 M, la hidroxiprolina liberada se oxidó durante 20 minutos a temperatura ambiente con 1 ml de una disolución de cloramina T 50 mM hasta obtener un derivado pirrólico, que se coloreó con la adición de 1 ml de una disolución aldehído/perclórico. La mezcla se incubó durante 20 minutos en un baño de agua a 65 °C, y tras atemperarla se procedió a medir la absorbancia a una  $\lambda$  de 550 nm.

Para la cuantificación, la absorbancia de cada muestra a 550 nm se interpoló en una recta patrón, que se realizó simultáneamente con distintas cantidades de gelatina (tipo A 300 bloom, Sigma G-8150).

- Tampón acetato-citrato: 22.9 g de ácido cítrico, 60 g de acetato sódico trihidratado, 6 ml de ácido acético glacial y 17 g de NaOH, se completaron hasta 500 ml con H<sub>2</sub>O.

- Disolución de cloramina T: se disolvieron 1.41 g de cloramina T (N-cloro-p-tolueno sulfonamida sódica) en 10 ml de n-propanol y 10 ml de H<sub>2</sub>O. Se añadieron 80 ml del tampón acetato-citrato.

- Disolución aldehído/perclórico: 15 g de p-dimetilaminobenzaldehído se disolvieron en 62 ml de n-propanol y 3.7 ml de H<sub>2</sub>O, y se le añadieron lentamente 22.3 ml de ácido perclórico 70%.

## 11. Técnicas electroforéticas

### 11.1. Electroforesis

Las proteínas de las diferentes muestras se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, SDS-PAGE. Se usaron geles verticales de 1.5 mm de espesor y el sistema de tampones descrito por Laemmli (1970).

Se prepararon geles de poliacrilamida discontinuos, en los que en la parte superior se colocaba el gel de concentración que contenía un 4% de una mezcla de acrilamida: bis-acrilamida 40:1.067 en tampón Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, glicerol al 5% y SDS al 0.1%, y en la inferior el gel de resolución contenía un 10% de poliacrilamida para las zimografías o diferentes gradientes lineales de poliacrilamida, según las proteínas a estudiar (4-10%, 4-12%, 4-20% y 6-20%), en tampón Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8 y SDS 0.1%. Tras la polimerización, los geles se pasaron a una cubeta de electroforesis para minigeles, que luego fue rellenada con tampón de electroforesis (Trizma base 50 mM, glicina 384 mM, SDS 0.1%, pH 8.3).

Las muestras, tras ser diluidas convenientemente con tampón Tris-HCl 0.075 M pH 6.8, 10% de glicerol, 4% de SDS, y 0.004% de azul de bromofenol, se desnaturalizaron mediante ebullición durante 5 minutos a 100 °C. Tras ser cargadas en los pocillos formados en el gel de concentración, se electroforetizaron junto con los marcadores de peso molecular a 150 voltios durante 90 minutos.

Una vez realizadas las electroforesis, los geles se tiñeron y secaron o se sometieron a inmunotransferencia.

Cuando las muestras a ensayar fueron de DNA se utilizaron geles de agarosa, que se obtenían disolviendo 1.125 g de agarosa en 75 ml de tampón TAE (Trizma base 0,04 M, ácido acético glacial 0.02 M, EDTA 1 mM) y 5 µl de Bromuro de Etidio al 1%.

A cada 10 µl de cada muestra se le añadieron 2.5 µl de tampón de carga que contenía 30% de glicerol y 0.175% de azul de bromofenol.

Tras la polimerización del gel se cargaron las muestras en los pocillos así como el marcador de número de pares de bases, realizándose la electroforesis a 100 voltios.

### **11.2. Western-Blot**

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, se transfirieron electroforéticamente a un soporte sólido, en nuestro caso papel de PVDF con un tamaño de poro de 0.2 µm, utilizando un sistema húmedo (Towbin *et al.*, 1979).

Sobre una placa de plástico (ánodo) se colocaron, una esponja humedecida en tampón de transferencia seguidas de una hoja de papel de filtro Whatman 3MM humedecidas en el mismo tampón y sobre éstas la membrana de PVDF previamente equilibrada en metanol durante 15 minutos y posteriormente con el tampón de transferencia. Encima de la membrana se colocó el gel cubriéndolo con una hoja de papel de filtro Whatman 3MM y una esponja humedecida en el tampón de transferencia. A continuación, se colocó otra placa de plástico que actuó como cátodo, y el conjunto se introdujo en una cubeta llena de tampón de transferencia.

En todos los pasos descritos se eliminaron cuidadosamente las burbujas de aire que de otra forma interferirían en el proceso de transferencia.

El tiempo de transferencia depende del tamaño de la proteína a transferir y del grosor del gel; en nuestro caso normalmente se emplearon 150 mA durante 18 horas. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se evaluó la efectividad de la transferencia tiñendo los geles con azul de Coomassie (métodos 12).

El tampón de transferencia contenía: glicina 192 mM, trizma-base 25 mM y 10% de metanol.

## **12. Métodos de detección de proteínas**

### **12.1. Detección de proteínas totales**

#### **12.1.1. Tinción con azul de coomassie**

Para teñir los geles de poliacrilamida se empleó una disolución del colorante al 0.2% en una mezcla de metanol al 50% y ácido acético al 10%. El tiempo de tinción fue de 2 horas. Seguidamente el exceso de colorante se eliminó mediante varios lavados con una disolución acuosa de metanol 50% y ácido acético al 10%.

En el caso de los geles con gelatina usados en las zimografías, la concentración del colorante fue de 0.05%, y el lavado se realizó con una disolución acuosa de metanol 25% y ácido acético al 10%.

#### **12.1.2. Tinción de plata**

Se utilizó el procedimiento descrito por Morrissey (1981), con algunas modificaciones.

Las proteínas previamente sometidas a electroforesis, se fijaron cubriendo el gel con una disolución de metanol al 50% y ácido acético 10%, por un periodo de 1 hora, a temperatura ambiente. Seguidamente se sustituyó esta disolución por otra similar pero con un contenido en metanol del 5%, durante 30 minutos. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con agua bidestilada, tras los cuales se añadió una disolución reductora de D-L ditiotreitól ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Pasados 30 minutos, se reemplazó por otra de nitrato de plata al 0.1%, con la que se incubó otros 30 minutos. Para eliminar los restos de plata superficiales, se lavó durante 5 minutos con agua bidestilada. Después pasamos a revelar, utilizando como reactivo revelador una disolución, de preparación extemporánea, de carbonato sódico al 3%, con una pequeña cantidad de formaldehído al 33% ( $50 \mu\text{l}/100 \text{ ml}$  de disolución). Inicialmente se adicionó una pequeña cantidad que fue descartada cuando adquirió una tonalidad amarillenta y sustituida por disolución reveladora nueva hasta conseguir un color adecuado de las bandas de proteína. Para detener el proceso de tinción se añadieron 10 ml de ácido acético concentrado.

### **12.1.3. Secado de geles**

Los geles sometidos previamente a los distintos procesos de tinción descritos arriba, se secaron siguiendo el siguiente procedimiento:

Se añadieron 50 ml/gel de la disolución de secado, manteniendo el gel en esta disolución durante 15-20 minutos con agitación suave. Se mojaron en esa misma disolución dos piezas de celofán durante 10 minutos, y se colocó el gel entre las dos piezas de celofán, evitando la formación de burbujas, sobre una placa de cristal.

El “sandwich” conseguido se mantuvo en posición horizontal, para eliminar el exceso de humedad, de 12-36 horas dependiendo de la humedad del gel. Cuando el celofán estaba seco al tacto, se presionó el gel, colocándolo bajo alguna superficie pesada, durante dos días. Transcurrido ese tiempo el gel estaba preparado para ser escaneado.

Disolución de secado: ácido acético 2%, glicerol 2.5%, isopropanol 10%.

## 12.2. Inmunodetección de proteínas electrotransferidas

Como paso previo a la inmunodetección, la membrana de PVDF se mantuvo en agitación durante 60 minutos, con una disolución de bloqueo que contenía leche descremada al 5% en tampón TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 0.15 M, Tween-20 0.05%), con el fin de bloquear los sitios de unión inespecíficos.

Esta disolución fue sustituida por otra que contenía el anticuerpo primario a la dilución oportuna (ver tabla 6 en métodos), previamente determinada en un ensayo preliminar utilizando diluciones seriadas en el mismo tampón. Tras una incubación de 1 hora, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con tampón TBST.

Después se añadió una disolución en TBST del anticuerpo anti IgG adecuado (ver tabla 6 en métodos), conjugado con fosfatasa alcalina o peroxidasa, y se incubó una hora en agitación. Tras ese periodo se realizaron otros tres lavados de 5 minutos con TBST, y se adicionó el sustrato adecuado en cada caso hasta la aparición de bandas.

Una vez desarrollado el color, la membrana se lavó con agua destilada, y se dejó secar en oscuridad.

Todo el proceso se desarrolló a temperatura ambiente.

Por último, la membrana de PVDF una vez seca se analizó densitométricamente. Para ello se digitalizó, utilizando el escáner HP scanjet 5400c, y se procesó con un software para análisis de imagen (ImageJ 1.38g, National Institutes of Health, USA).

En el caso de anticuerpos anti IgG conjugados con fosfatasa alcalina el sustrato revelador se preparó añadiendo 66  $\mu$ l de una disolución de azul de nitrobluetetrazolio (50 mg/ml en N,N-dimetilformamida al 70%) y 33  $\mu$ l de una disolución de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (50 mg/ml en N,N-dimetilformamida), a 10 ml de un tampón compuesto por Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

Cuando se utilizó como enzima conjugado la peroxidasa, para el revelado se siguió el método descrito por De Blas para intensificar el color del precipitado (De Blas y

Cherwinski, 1983). El sustrato se preparó disolviendo 50 mg de 3,3'-diaminobencidina en 100 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7.4, añadiéndose posteriormente 3 ml de una disolución de  $\text{CoCl}_2$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{NiSO}_4$ , ambos al 1%, muy lentamente y en agitación constante. 50 ml de esta mezcla se vertieron sobre la membrana de PVDF. Tras 10 minutos en agitación, se sustituyó por los restantes 50 ml a los que se había añadido 3 ml de peróxido de hidrógeno del 30%. Una vez desarrollado el color, se procedió como se describe anteriormente.

Anticuerpo	Características Inmunológicas	Referencias	Dilución	Anticuerpo secundario usado	Dilución
Anti-colágeno IV	Policlonal H-234	Santa Cruz Sc-11360	1/100	Anti-conejo IgG-AP (Proomega)	1/7500
Anti-colágeno I	Policlonal	Calbiochem 234167	1/1000	Anti-conejo IgG-AP (Proomega)	1/7500
Anti- $\alpha$ 1(IV)	Monoclonal H-11	Cedido por el Dr. Y. Sado, (Sado <i>et al.</i> 1995)	1/100	Anti-ratón IgG-AP (Proomega)	1/15000
Anti- $\alpha$ 2(IV)	Monoclonal H-22	Cedido por el Dr. Y. Sado, (Sado <i>et al.</i> 1995)	1/100	Anti-ratón IgG-AP (Proomega)	1/15000
Anti- $\alpha$ 3(IV)	Monoclonal H-31	Cedido por el Dr. Y. Sado, (Sado <i>et al.</i> 1995)	1/100	Anti-ratón IgG-AP (Proomega)	1/15000
Anti- $\alpha$ 4(IV)	Monoclonal H-44	Cedido por el Dr. Y. Sado, (Sado <i>et al.</i> 1995)	1/100	Anti-ratón IgG-AP (Proomega)	1/15000
Anti- $\alpha$ 5(IV)	Monoclonal H-52	Cedido por el Dr. Y. Sado, (Sado <i>et al.</i> 1995)	1/50	Anti-ratón IgG-AP (Proomega)	1/15000
Anti-laminina $\alpha$ 5	Policlonal H-160	Santa Cruz Sc-20145	1/200	Anti-conejo IgG-AP (Proomega)	1/7500
Anti-laminina 1 ( $\beta$ 1 y $\gamma$ 1)	Policlonal	Sigma L9393	1/4000	Anti-conejo IgG-AP (Proomega)	1/7500
Anti-TIMP1	Policlonal H-150	Santa Cruz Sc-5538	1/100	Anti-conejo IgG-AP (Proomega)	1/7500
Anti-TIMP2	Policlonal H-140	Santa Cruz Sc-5539	1/100	Anti-conejo IgG-AP (Proomega)	1/7500

**Tabla 6.** Anticuerpos primarios y secundarios usados para inmunodetección de proteínas.

### 13. Determinación de actividad colagenasa

Para determinar si existían cambios en las actividades colagenasa, se realizaron zimografías en geles de gelatina.

Las muestras se diluyeron convenientemente en tampón de muestra que contenía SDS al 1%, y se separaron mediante electroforesis unidimensional, SDS-PAGE, en un gel de separación con una concentración de acrilamida del 10% y con gelatina (tipo A 300 bloom, Sigma G-8150) a 1 mg/ml, a 130V durante 30 minutos y 170V 90 minutos, en frío (0-4 °C).

Tras la electroforesis el gel se lavó con agua bidestilada y se incubó 15 minutos en agitación con Tritón X-100 al 2.5%, para eliminar el exceso de SDS. Posteriormente se equilibró con el tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Tritón X-100 al 2.5% durante dos periodos de 30 minutos en agitación. Finalmente el gel se incubó durante 16 horas, a 37 °C, y en agitación, con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 2 μM y NaN<sub>3</sub> 0.05%.

Con el fin de asegurar que toda la actividad detectada se debía a la acción de colagenasas, paralelamente al anterior se hicieron dos ensayos con otros dos geles que contenían las mismas muestras y se habían sometido al mismo proceso de electroforesis.

En el primero de los dos ensayos se pretendía inhibir la posible actividad de proteasas, para ello se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito, con la salvedad de que en las dos primeras incubaciones al tampón se le añadieron inhibidores de proteasas.

En el segundo ensayo el tampón utilizado para equilibrar los geles fue Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Tritón X-100 al 2.5%, y EDTA 50 mM. Para la posterior incubación, se usó éste mismo tampón sin el Tritón X-100 al que se le añadió azida sódica hasta una concentración final de 0.05%. Al carecer el tampón de iones Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, se inhibieron las colagenasas. El EDTA se añadió con el fin de quelar los posibles iones endógenos.

En ambos ensayos la incubación se realizó en iguales condiciones que en el primer caso.

Para poder visualizar la actividad colagenasa, se tiñeron los geles con azul de Coomassie (Métodos 12).

En algunos ensayos, antes de realizar la electroforesis, se trataron las muestras con acetato de p-aminofenilmercurio para inducir la activación de las procolagenasas. Para ello se añadieron a 2.5  $\mu$ l de muestra 1  $\mu$ l del mismo en una concentración de 10 mM, se ajustó el pH a 8.0 con HCl 0.1 N, y se completó hasta 10  $\mu$ l con agua. Las muestras se dejaron incubando a 37 °C, durante 30 minutos y después se procedió con ellas de la misma forma que con las muestras no tratadas.

## **14. Análisis de mRNA mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real**

### **14.1. Aislamiento de RNA total**

Para aislar RNA total a partir de tejido de rata se utilizó el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987), en el que un homogenado de tiocianato de guanidina se extrae con fenol:cloroformo a pH ácido. El tiocianato de guanidina es un agente caotrópico que rompe las células, solubiliza sus componentes y desnaturaliza las RNAsas endógenas simultáneamente.

Se tomó un trozo de tejido congelado de cada muestra (0.1-0.5 g), y se le añadieron 2 ml de una disolución desnaturalizante que estaba formada por tiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7, lauril sarcosinato sódico 0.5 % (p/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1 M. Se homogeneizó en un Ultraturrax y después se sometió 12 veces a un proceso de aspiración-expulsión con jeringuilla de insulina para disgregar el DNA.

A continuación, se dividió el homogenado en dos alícuotas de 500  $\mu$ l y a cada una de ellas se le añadieron 50  $\mu$ l de acetato sódico 2 M, pH 4.0, se agitó y se añadieron 500

$\mu\text{l}$  de Fenol/ $\text{H}_2\text{O}$ , se agitó y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó de nuevo y se incubó en hielo durante 15 minutos.

Transcurridos los 15 minutos, la muestra se centrifugó a 15000 g, durante 20 minutos en frío (0-4 °C), y se recogió la fase acuosa, midiéndose el volumen para añadirle un volumen igual de isopropanol. Se mezcló por inversión y se dejó precipitar 1 hora a -20 °C, tras lo que se centrifugó a 15000 g durante 20 minutos en frío (0-4 °C).

Tras la centrifugación se desprecó el sobrenadante y el sedimento obtenido se lavó con 500  $\mu\text{l}$  de LiCl 4 M, se agitó y se incubó en hielo durante 4 minutos, entonces se centrifugó a 10000 g, 10 minutos, en frío (0-4 °C). Después el sedimento se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de disolución desnaturizante guanidium- $\beta$ -mercaptoetanol por aspiración-expulsión y se añadió un volumen igual de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó precipitando toda una noche a -20 °C. Pasado ese periodo, se centrifugó a 15000 g, durante 20 minutos en frío (0-4 °C). Se lavó el sedimento con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% frío (-20 °C), y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos en frío (0-4 °C). Se repitieron los lavados con etanol 1 ó 2 veces, y se dejó secar el sedimento perfectamente. Finalmente se resuspendió en 30  $\mu\text{l}$  de agua DEPC, congelándolo hasta su uso a -80 °C.

El agua DEPC se consigue añadiendo 1 ml de dietilpirocarbonato a 1 litro de agua ultrapura y dejándolo en agitación, en campana de extracción, toda una noche, para autoclararlo a la mañana siguiente.

Todo el proceso se realizó con material libre de RNAasas y se operó en todo momento con guantes.

## 14.2. Análisis cualitativo del RNA

En primera instancia se evaluó la calidad del RNA aislado midiendo su absorbancia a 280 y 260 nm, descartando las muestras cuyo cociente de  $A_{260}/A_{280}$  no estuvo comprendido entre 1.8 y 2.

Para conocer exactamente el estado del RNA aislado 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra se analizó utilizando el sistema comercial “Agilent RNA 6000 Nano assay Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El sistema se basa en una electroforesis en chip utilizando analizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). La electroforesis tiene lugar en pequeños canales grabados sobre un soporte sólido (chip). La presencia de RNA se determina mediante la excitación por láser de un fluoróforo que se une específicamente a este tipo de moléculas.

El tratamiento de los datos se realiza con un software específico que muestra una imagen virtual de un gel de electroforesis y un perfil de picos (electroferograma) para las diferentes bandas de los RNAs. Al mismo tiempo se cuantifica cada una de las bandas mostrando su tamaño, su concentración en ng/ml y su molaridad.

### **14.3. Cuantificación de los niveles de mRNA por RT-PCR cuantitativo en tiempo real**

#### **14.3.1. Transcripción reversa (RT)**

La transcripción reversa se llevó a cabo con el kit Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante, y en el termociclador Mastercycler 5333 (Eppendorf).

Para la reacción se utilizaron 2  $\mu\text{g}$  de RNA diluido hasta un volumen de 33  $\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O}$ . A cada muestra se le añadieron 2  $\mu\text{l}$  de cebadores, Random Hexamer (100 ng/ $\mu\text{l}$ ), se agitaron y se le dio un golpe de centrifuga. Todo el proceso se realizó en frío.

La mezcla se preincubó 10 minutos a 75 °C y se traspasaron 33  $\mu\text{l}$  al tubo del Kit que contenía la Transcriptasa reversa de Murina (FPLCpure™), el tampón de reacción, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, BSA (libre de RNAasa y DNAasa) y RNAGuard™, y se incubó 10 minutos a 25 °C y 90 minutos a 37 °C. Por último, cuando acabó la reacción, las muestras se dejaron en hielo durante 1 minuto y se guardaron a -20 °C si se iban a utilizar en breve, o a -80 °C si se iba a tardar más de un mes en utilizarlas.

### 14.3.2. Preparación de estándares

Para determinar la concentración de cDNA en las muestras se incluyó un curva de calibración en cada una de las reacciones. La curva de calibración de cada uno de los genes analizados se construyó a partir de cDNA de concentración conocida (cDNA estándar). Este cDNA se preparó, para cada gen, mediante amplificación de cDNA obtenido de tejido pulmonar de los distintos grupos de estudio (como se describe en el apartado anterior).

Oligos de los Estándares	Secuencia	Tamaño (pb)
COL4A1	5' - CTCTGCTCTATGTCCAAGGAAACG - 3' 5' - CACAAAGGAATAGCCAATCCACAG - 3'	338
COL4A2	5' - CTGGACCCAAAGGACAACCAG - 3' 5' - GGGTCCTAGTTCTCCCCGTTCTC - 3'	365
COL4A3	5' - GGTTTTCCCTTCTTTTCGTACAAGG - 3' 5' - GGGATAGCAGTGGTTTACTGTG - 3'	295
COL4A4	5' - GTCACGGGTGGATTACCTCCAG - 3' 5' - GTGACCCCGAGATCCCTTTTC - 3'	319
COL4A5	5' - GGCAGATCAGTGAACAGAAAAGACC - 3' 5' - GTTGCCCAATATTTCTTTTGCTC - 3'	366
COL1A1	5' - CTACTGGCCCTCCTGGCTTC - 3' 5' - CTCCTTTGGCACCAGTGTCTC - 3'	333
COL1A2	5' - CAGTATTCTGACAAAGGAGTTTCAGC - 3' 5' - CAGGCTGTCTTTCAATCCATC - 3'	340
COL3A1	5' - CCTGGTCAGCCTGGTACAGC - 3' 5' - GTTCACCAGTTTCACCTTTGTAC - 3'	298
LAMA2	5' - TTGAAACCTGGGTCCTGTTACTG - 3' 5' - CCAGAGAGGTCTGTGAGGTACCAG - 3'	341
LAMA4	5' - CAGAGCCATCACCTCGAAGC - 3' 5' - AACTGTGCAAATTTCTGCTTAGCTC - 3'	314
LAMA5	5' - GACCTCTACTGCAAGCTGGTTGG - 3' 5' - CCTCTGGAGGAGGCAAAGAAC - 3'	345
LAMB1	5' - GCACAGTGAGGGAGCATTGTAAC - 3' 5' - AACACCCTCCACACAGACACAC - 3'	371
LAMC1	5' - ATCAACCGGACCATAGCTGAAG - 3' 5' - TTCCTGAGCAGCCTGTGAAG - 3'	315
B2MG	5' - AGAAAACCTCCCAAATTCAAGTGTA - 3' 5' - TCCAGATGATTCAGAGCTCCATAG - 3'	343

**Tabla 7.** Oligonucleótidos empleados para la obtención de los estándares.

La amplificación se realizó por PCR clásica, con los cebadores correspondientes (Tabla 7), aplicando manualmente la técnica del hotstart (Chou *et al.*, 1992). Esta técnica de hotstart se introdujo con el fin de evitar reacciones inespecíficas (sobre todo la generación de dímeros de los cebadores), debidas a la hibridación inespecífica de los cebadores a bajas temperaturas (de 4 a 25 °C) antes del comienzo de la amplificación. La hotstart consiste en utilizar una Taq polimerasa termoestable, con lo que no hace falta trabajar en frío, evitando las reacciones inespecíficas, y su eficiencia es mayor.

La reacción de PCR contenía 2 µl de cDNA (50 ng/µl), 5 µl de tampón de reacción 10X, 2.5 µl de Q (coadyuvante), 1 µl de cada dNTP (200 µM), 5 µl de cada cebador 10 µM, 0.25 µl de HotStar Taq DNA polimerasa (Qiagen) (5 unidades/µl) y agua hasta un volumen final de 50 µl. La PCR se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) y las condiciones fueron las siguientes:

- desnaturalización, y activación de la Taq polimerasa a 95 °C durante 12 minutos.
- a continuación se procedió a amplificar los fragmentos de cDNA de cada gen, que consistió en 45 ciclos de:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	95	15
Hibridación	60	15
Elongación	72	45

- y por último la extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Una alícuota del cDNA resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% para comprobar la presencia de una única banda del tamaño esperado. El resto de cDNA amplificado se purificó para eliminar restos no deseados. La purificación del producto se realizó por cromatografía en columna (High Pure PCR Product. Purification Kit. Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se determinó la concentración de DNA mediante espectrofotometría.

Los fragmentos de cDNA puros y de concentración conocida se diluyeron y utilizaron como estándares para las amplificaciones de PCR en tiempo real.

### 14.3.3. PCR cuantitativo en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real, como su nombre indica, permite el seguimiento de la reacción en tiempo real mediante medidas de fluorescencia y, por lo tanto, se puede identificar fácilmente las tres fases de la reacción de PCR. La fase inicial, donde la señal corresponde al ruido de fondo (*background*), una fase de crecimiento exponencial y una última fase denominada "*plateau*". Esto permite el análisis de los datos en la fase exponencial, donde la eficiencia de la reacción es constante, y el incremento de la fluorescencia es proporcional al crecimiento exponencial del producto amplificado, por lo que la cantidad de material inicial en cada muestra se puede calcular con una gran precisión, mediante la determinación del punto de corte ( $C_T$ , Threshold cycle) de cada amplificación. Este punto de corte, es el ciclo en el cual la fluorescencia aumenta por encima del *background* y coincide con el máximo de la segunda derivada de la fluorescencia con respecto al ciclo de la reacción (Bernard y Wittwer, 2002). El ciclo en el que la segunda derivada es máxima ( $C_T$ ), se encuentra en la fase exponencial, puesto que la señal de fluorescencia aumenta durante esta fase y disminuye cuando la reacción comienza a entrar en la fase de saturación (*plateau*).

Para la cuantificación de los genes analizados (tabla 7), se empleó el kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), que usa el SYBR Green I para la detección del DNA de doble cadena y la AmpliTaq Gold® DNA polimerasa. El termociclador en tiempo real utilizado fue el 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), y las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. El programa informático utilizado para analizar la señal recogida por el detector fue el Sequence Detection Systems Software v2.2.1. (Applied Biosystems).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 14  $\mu$ l, conteniendo 2  $\mu$ l de cDNA (diluido 1:10), 0.6  $\mu$ l de la mezcla de oligonucleótidos 5 mM (Tabla 8), 7  $\mu$ l del SYBR Green PCR Master Mix 2X y 4.4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

Oligos de PCR cuantitativa	Secuencia	Tamaño (pb)
COL4A1	5' – CTCTGCTCTATGTCCAAGGAAACG – 3' 5' – CAGACGTTGTTGATGTTGCAGAAG – 3'	118
COL4A2	5' – CCGGATATGTACAAGGGTAAAAG – 3' 5' – GCTTCCTTTCTGCCTGAGACTCC – 3'	153
COL4A3	5' – GGTTTTCCCTTCTTTTCGTACAAGG – 3' 5' – TGAATAATCATTTTCGTGATGCAAAGTTAC – 3'	152
COL4A4	5' – CCCCTGGTCACTGATATTTATCCTC – 3' 5' – GTGACCCCGAGATCCCTTTTC – 3'	133
COL4A5	5' – GTTTCCTGGTGATCCTGGTTAC – 3' 5' – GTTGCCCAATATTTCTTTTGCTC – 3'	153
COL1A1	5' – ATGGTGCTCCTGGTATTGCTG – 3' 5' – CTCCTTTGGCACCAGTGTCTC – 3'	150
COL1A2	5' – GAAGATGGTCACCCTGGAAAAC – 3' 5' – CAGGCTGTCCITTCATCCATC – 3'	151
COL3A1	5' – CCAAGGTCTTCCTGGTCAGC – 3' 5' – AGAACCATTTTCACCACGATCAC – 3'	127
LAMA2	5' – TCCAGACTGTCAACCCTGTAAGT – 3' 5' – ACAGCCTTTCTGATTTTCCTCTTG – 3'	157
LAMA4	5' – CAGAGCCATCACCTCGAAGC – 3' 5' – TGCATTCTTTATTATCTCATCAAGTTCC – 3'	157
LAMA5	5' – GACCTCTACTGCAAGCTGGTTGG – 3' 5' – ATCGATGGCGTTGCTCACAG – 3'	132
LAMB1	5' – CAGGAGCTCTTCTGGGGAGAC – 3' 5' – AACACCCTCCACACAGACACAC – 3'	120
LAMG1	5' – GAGAAGACAAGGGAGGCACAG – 3' 5' – TGGTACTGGTGGCATTCTCTG – 3'	124
B2MG	5' – CAGTTCACCCACCTCAGATAGA – 3' 5' – ATTCAGTGTGAGCCAGGATGTAG – 3'	118

**Tabla 8.** Oligonucleótidos empleados para la reacción de PCR Cuantitativa.

La mezcla de la reacción se introdujo en los pocillos de las placas (MicroAmp® Optical 96-well Reaction plate. Applied Biosystems) y se centrifugó durante 2 minutos a 200 g. A continuación la placa se introdujo en el termociclador, donde se realizó la PCR cuantitativa en tiempo real. Los pasos seguidos fueron:

- Desnaturalización y activación de la Taq polimerasa a 95 °C durante 12 min.
- Amplificación (40 ciclos). La señal de fluorescencia se detecta al final de cada paso de elongación. Las condiciones de la amplificación son:

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización	95	15
Hibridación-Elongación	62	60

- Para comprobar la pureza del producto amplificado, se generaron las curvas de disociación para cada gen y muestra, mediante el calentamiento a 95 °C e inmediato enfriamiento a 65 °C, manteniéndose esta temperatura durante 15 segundos, tras lo cual se vuelve a subir a 95 °C durante otros 15 segundos, midiéndose la fluorescencia de manera continua.

El gen de referencia utilizado para normalizar todas las cuantificaciones fue la  $\beta$ -2microglobulina, medida para cada una de las muestras. Previamente se comprobó que no se veía afectado en nuestras situaciones experimentales.

Como control negativo se utilizó DNA de salmón para todos los genes analizados.

## 15. Procesamiento de las muestras para microscopía electrónica

### 15.1. Muestras destinadas a análisis morfológicos

El pulmón de ratas control, VAD y AR fue procesado y tratado para su estudio por microscopia electrónica tal como se describe en el protocolo establecido por Megías y Renau, 1998. El protocolo se desarrollo como se describe a continuación:

#### 15.1.1. Postfijación y tinción

Los fragmentos de pulmón destinados al estudio morfológico, se colocaron en viales de vidrio donde fueron postfijados y teñidos siguiendo los siguientes pasos. Se incubaron con una disolución de 1% de paraformaldehído (16% grado ME) + 1.5% de glutaraldehído (25% grado ME) en tampón cacodilato 0.05 M pH 7.4, durante 60 minutos a 4 °C. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con tampón cacodilato

0.1 M pH 7.4, a 4 °C. Tras los lavados las muestras se pusieron en contacto con una disolución de tetróxido de osmio al 1% y ferricianuro potásico al 1%, durante 60 minutos a 4 °C, en oscuridad. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua destilada, a 4 °C. A continuación, las muestras se fijaron en ácido tánico 0.15%, en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4, 1 minuto, a temperatura ambiente. Tras ser lavadas a temperatura ambiente con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4, y posteriormente con agua destilada (2 lavados de 5 minutos), las muestras se pusieron en contacto con una disolución de acetato de uranilo al 2% en agua bidestilada, 120 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, tras lo cual, se realizaron 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente.

### **15.1.2. Deshidratación**

Las muestras fueron deshidratadas mediante tratamiento con etanol, siguiendo un gradiente creciente de concentración. Se trataron las muestras durante 5 minutos a 4 °C, con soluciones de etanol al 50%, 75%, 90%, 95% y tres veces al 100%.

### **15.1.3. Infiltración**

Las muestras deshidratadas se infiltraron en Epon 812, resina epoxialifática de naturaleza hidrofóbica, muy útil para estudios ultraestructurales. Todos los recipientes utilizados para su preparación deben estar bien secos, ya que la humedad dificulta la polimerización.

Para su obtención se parte de cuatro componentes comerciales, que se conservan a 4 °C: Epon 812 (resina), DDSA y MNA (endurecedores), y BDMA al 3% (acelerador).

El procedimiento para su preparación es el siguiente. Se colocan en una estufa a 60 °C los frascos que contienen la resina y los endurecedores, una probeta de cristal graduada y un Erlenmeyer, durante 10 minutos. A continuación se vierten 20 ml de resina epoxi en una probeta, a los que se añaden 16 ml de DDSA y 8 ml de MNA, pasando inmediatamente la mezcla a un erlenmeyer. Se agita lenta y manualmente, para evitar la formación de burbujas de aire, durante unos minutos, hasta obtener una mezcla clara y sin estructuras. Por último se añaden 1.3 ml de BDMA y se continua agitando durante 1-2 minutos.

La infiltración se realizó tratando las muestras con Epon:Etanol (1:2, v/v), durante 60 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente con Epon:Etanol (1:1, v/v), durante otros 60 minutos a temperatura ambiente. Tras éste, con Epon:Etanol (2:1, v/v), durante 60 minutos a temperatura ambiente. Y por último con Epon completo, toda la noche a 4 °C.

Una vez finalizado este proceso, las muestras deben quedar completamente sumergidas en resina.

#### **15.1.4. Encapsulado y polimerización**

Las muestras fueron depositadas en el fondo de cápsulas de gelatina, que se rellenaron con Epon completo recién preparado, y se colocaron en estufa a 60 °C durante 48 horas. Posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

#### **15.2. Muestras destinadas a análisis inmunocitoquímico**

El protocolo utilizado fue el descrito por Renau-Piqueras *et al.*, (1989) que a continuación se detalla.

##### **15.2.1. Postfijación**

Los fragmentos fueron postfijados con la misma disolución fijadora que se utilizó para la perfusión (ver Métodos apartado 2), manteniéndolos en ella durante 120 minutos a temperatura ambiente. A continuación, tras lavar las muestras 3 veces durante 15 minutos con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4, a temperatura ambiente, se incubaron en una disolución de cloruro amónico 50 mM en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4, para el bloqueo de los grupos aldehído libres, durante 50 minutos a 0 °C. Finalmente se volvieron a lavar las muestras con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4, 3 veces durante 10 minutos, a 0 °C.

### 15.2.2. Deshidratación

Las muestras fueron deshidratadas mediante tratamiento con metanol, siguiendo un gradiente creciente de concentración. Se trataron las muestras durante 5 minutos a 4 °C, con soluciones de metanol al 30%, 50%, después al 70% 5 minutos a -10 °C y por último metanol al 90% durante 30 minutos a -20 °C.

### 15.2.3. Infiltración

Las muestras se infiltraron en la resina acrílica Lowicryl K4M, que se obtiene a partir de tres componentes mezclados en la siguiente proporción: 4 g de cross-linker, 26 g de monómero y 0.15 g de iniciador. Se mezcla cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. El proceso se realiza en campana, con protección de guantes y mascarilla, por la elevada toxicidad de los vapores de Lowicryl.

La infiltración se realizó tratando las muestras con metanol:Lowicryl (1:1 v/v), durante 60 minutos a -20 °C. Seguidamente con metanol:Lowicryl (1:2 v/v), durante otros 60 minutos a -20 °C. Tras éste, con Lowicryl puro, durante 60 minutos más a -20 °C. Y por último con Lowicryl puro, toda la noche a -20 °C.

### 15.2.4. Encapsulado y polimerización

Las muestras fueron encapsuladas en cápsulas de gelatina transparente cerradas (sin aire) rellenas de Lowicryl K4M recién preparado, y se colocaron en un arcón cerrado forrado de papel de aluminio para facilitar el acceso indirecto de la luz a las cápsulas. La polimerización se realizó bajo una lámpara ultravioleta ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) Philips TL6/05 situada a unos 30 cm. de las muestras, durante 7 días a -20 °C. Posteriormente se pasaron a otro arcón con similares características, pero a temperatura ambiente, en el que permanecieron otros 7 días, hasta el momento de su recogida. Después se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Todo el proceso, salvo la fijación, se realizó a bajas temperaturas con el fin de preservar al máximo posible la capacidad antigénica de las proteínas a estudiar.

## **16. Obtención y tinción de secciones semifinas y ultrafinas**

### **16.1. Obtención de secciones semifinas**

A partir de las muestras encapsuladas, tanto en Epon como en Lowicryl, se obtuvieron cortes semifinos de 1  $\mu\text{m}$ , con el fin de seleccionar las zonas de mayor interés. Estos cortes se obtuvieron en ultramicrotomo LKB Bromma modelo 8800 ultratome III, con cuchillas de vidrio. Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina para su observación en un microscopio Olympus en campo claro.

### **16.2. Tallado**

Una vez localizada la zona de interés, tras la observación del corte semifino al microscopio, se procedió a delimitar una región trapezoidal de aproximadamente 1  $\text{mm}^2$  de área para la posterior obtención de cortes ultrafinos. Operación que se realizó de forma manual con una hoja de bisturí.

### **16.3. Obtención de secciones ultrafinas**

Las piezas talladas, se colocaron en el ultramicrotomo Ultracut Reichert Jung, para ser cortadas con una cuchilla de diamante. Se orientó la superficie de corte de manera que quedara paralela al filo de la cuchilla, y se fijó un espesor de corte de unos 90 nm. Las secciones obtenidas se seleccionaron por su espesor, indicado por el color de interferencia que presentan, siendo las más adecuadas las plateadas. Finalmente se recogieron sobre la cara mate de rejillas filmadas bien de cobre, en el caso de las secciones de Epon, bien de níquel, para las secciones de Lowicryl.

### **16.4. Tinción de cortes ultrafinos con acetato de uranilo y citrato de plomo**

Se siguió el protocolo descrito por Megías y Renau, (1998).

#### 16.4.1. Preparación de acetato de uranilo

Se preparó una disolución de acetato de uranilo al 2% (p/v) en agua bidestilada, se filtró y almacenó a 4 °C, protegida de la luz para evitar la formación de precipitados. Previamente a su uso se volvió a filtrar a través de filtro Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### 16.4.2. Preparación de citrato de plomo

Se preparó disolviendo 3.52 g de citrato sódico en 60 ml de agua bidestilada, a lo que se añadió 2.66 g de nitrato de plomo. La suspensión se agitó durante 1 minuto, y se dejó reposar durante 30 minutos, agitando cada 5 minutos hasta la completa suspensión del nitrato de plomo, resultando una disolución turbia de aspecto lechoso. Finalmente se añadieron 16 ml de NaOH 1 N en agitación, poco a poco hasta que la disolución se tornó completamente transparente, y se enrasó a 100 ml con agua bidestilada.

Toda el agua utilizada fue previamente hervida, para evaporar la mayor cantidad posible de gases disueltos en ella, principalmente  $\text{CO}_2$ , y enfriada a temperatura ambiente.

#### 16.4.3. Tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo

Las rejillas con los cortes ultrafinos se pusieron en contacto sobre una gota de acetato de uranilo de aproximadamente 20  $\mu\text{l}$ , dispuesta sobre una lámina de parafilm, durante 20 minutos. Después se lavaron con agua bidestilada dos veces, y se secaron al aire. A continuación se pusieron en contacto sobre una gota de la disolución de citrato de plomo, durante 1 minuto, lavando inmediatamente con un chorro continuo de agua bidestilada, y dejándolas secar al aire. Este segundo tratamiento de contraste se realizó en presencia de NaOH, que elimina el  $\text{CO}_2$  ambiental con el que el plomo tiende a reaccionar para formar carbonato de plomo que es electrodenso, y puede interferir en la posterior visualización de las muestras.

## 17. Estudios de ultraestructura

La evaluación de los cambios, a nivel estructural, inducidos por la deficiencia en vitamina A sobre la membrana basal y su posible recuperación con la administración de ácido retinoico, se realizó sobre secciones ultrafinas de muestras de pulmón incluidas en Epon 812, procedentes de animales controles, VAD y RR.

Los cambios en la ultraestructura de la membrana basal pulmonar, de los animales VAD y RR, así como la variación en su grosor con respecto a los controles, se observaron sobre positivados en papel de negativos de micrografías obtenidas con microscopio electrónico de transmisión Philips CM-100. Las micrografías se obtuvieron a 13500 aumentos que se incrementaron posteriormente durante su positivado en papel.

Las micrografías se realizaron sobre distintas zonas alveolares del pulmón, seleccionadas aleatoriamente, de rejillas elegidas al azar de entre las disponibles para cada muestra.

El número de micrografías que se hicieron para cada serie fue al menos de 30 y sobre ellas se midió el grosor de la membrana basal, en distintas zonas. Posteriormente se calculó la media, y su correspondiente desviación estándar, para la serie control, la VAD y la RR, que luego se compararon mediante el test ANOVA en un solo paso, aplicando el post-test de Bonferroni.

La idoneidad del número de micrografías se comprobó con el test de la media progresiva, que consiste en comparar porcentualmente la medida del parámetro en cada micrografía, con la media obtenida para el total de la serie.

## 18. Inmunocitoquímica

Las pruebas inmunocitoquímicas se realizaron sobre secciones ultrafinas de muestras de pulmón incluidas en Lowicryl K4M, procedentes de animales controles, VAD y RR siguiendo el procedimiento descrito por Hayat (1992). Los cortes ultrafinos fueron realizados en el momento de su uso en el ultramicrotomo citado previamente, y

se montaron en rejillas de níquel filmadas, tratándose después de la siguiente manera. Las rejillas se colocaron sobre gotas de peróxido de hidrógeno al 3% en agua bidestilada, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron por inmersión 3 veces en agua bidestilada a temperatura ambiente. A continuación se trataron las rejillas, colocándolas sobre gotas de 0.1% BSA-Tris-HCl 50 mM pH 7.5 suplementado con 5% de FCS inactivado durante 30 minutos a 37 °C, en cámara húmeda. Después, se incubaron sobre gotas de tampón 0.1% BSA-Tris-HCl 50 mM pH 7.5 conteniendo 1% de FCS inactivado, y el anticuerpo primario anti-colageno I (Calbiochem 234167), dilución 1/600, 120 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Tras lavar 3 veces durante 10 minutos sobre gotas de tampón 0.1% BSA-Tris-HCl 50 mM pH 7.5, las rejillas se pusieron sobre gotas de tampón 0.1% BSA-Tris-HCl 50 mM pH 7.5 conteniendo 0.05% Tween 20, 5% FCS y el anticuerpo secundario anti-conejo marcado con oro coloidal de 10 nm a una dilución de 1:10, durante 60 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Por último se lavaron las rejillas sobre gotas de agua bidestilada, durante 10 minutos a temperatura ambiente, se secaron al aire y se contrastaron con acetato de uranilo al 2%, durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Paralelamente a cada prueba inmunocitoquímica, se realizaron controles en los que se suprimía el tratamiento con el anticuerpo primario, lo que nos daba una idea del reconocimiento inespecífico por parte del anticuerpo secundario marcado con oro coloidal.

## 19. Procedimientos generales

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza de tipo ANOVA en un solo paso, aplicando el post-test de Bonferroni en aquellos casos que el análisis de varianza lo permitiera, para un nivel de significación mínimo del 95%.

El software utilizado para analizar la señal de fluorescencia recogida en las PCR cuantitativas en tiempo real fue el Sequence Detection Systems Software v2.2.1. (Applied Biosystems).

El software utilizado para el tratamiento gráfico y estadístico de los datos fue: Pages'08 (Copyright © Apple Inc.) y Microsoft Excel 2004 for Mac (Microsoft Corporation, © 2004), Prism 4 for Macintosh (GraphPad Software, Inc. © 2005).

El software utilizado para el procesamiento de imágenes fue: Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated, © 2007), ImageJ 1.38g (National Institutes of Health, USA).

## **RESULTADOS**

## 1. Modelo experimental de deficiencia de vitamina A crónica

### 1.1. Estudio del peso corporal, pulmonar, renal y cardiaco en ratas control y deficientes en vitamina A

Hay estudios contradictorios respecto al efecto de la deficiencia de vitamina A sobre el peso corporal y el peso de los órganos de animales tratados. Para comprobar cómo afectaba la restricción de vitamina A en la dieta al peso corporal y al de algunos órganos, en nuestros animales de experimentación, se determinaron estos parámetros el día del sacrificio. Para ello, se pesaron los animales al finalizar el periodo de 60 días necesario para causar una deficiencia crónica de vitamina A, y durante el cual los animales fueron alimentados con cantidades equivalentes de las dietas control y VAD.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en el peso corporal de animales control y animales VAD (Tabla 9). Tras sacrificar a los animales, se procedió a extraer los pulmones, riñones y corazón, y a pesarlos. Estos órganos fueron elegidos por su alto contenido en MEC, y por que en ellos la MB tiene funciones de gran importancia para la vida animal. En este caso tampoco encontramos diferencias significativas entre los grupos de estudio en ninguno de los órganos analizados (Tabla 9).

	CONTROL	VAD
PESO CORPORAL (g)	295.95 ± 18.39	261.64 ± 15.49
PESO PULMONES (g)	1.57 ± 0.16	1.45 ± 0.22
PESO RIÑONES (g)	2.05 ± 0.09	1.86 ± 0.19
PESO CORAZÓN (g)	0.95 ± 0.10	0.90 ± 0.11

**Tabla 9.** Cuantificación del peso corporal, pulmonar, renal y del corazón, de animales control y deficientes en vitamina A. Los valores se muestran como media ± SD, N fue 6 para ambos grupos. No existen diferencias significativas entre ellos.

No obstante, a pesar de no encontrar diferencias significativas en el peso de los grupos de animales sí se observó una tendencia a la disminución del peso y el tamaño en los animales privados de vitamina A. En el caso de los órganos ocurrió lo mismo, a pesar de no haber diferencias significativas, los pesos eran ligeramente inferiores en

los animales VAD. Además, en el grupo de animales sometidos a la dieta VAD eran apreciables algunas diferencias en la pigmentación de la piel, que se mostraba con un aspecto irregular, grisáceo, y con frecuentes manchas oscuras en la cola. Estos animales aparecían encorvados y debilitados.

## 1.2. Valoración de los retinoides mayoritarios en plasma y en pulmón

Era importante conocer el estatus de los retinoides mayoritarios en plasma y en pulmón, órgano de estudio en este trabajo, en los grupos de animales alimentados con dieta VAD (animales VAD y RR) y en los animales control, ya que la única diferencia en cuanto a la proporción de macro y micronutrientes ingeridos por los grupos experimentales fue la cantidad de vitamina A administrada. Y por tanto, para poder atribuir las alteraciones observadas a la deficiencia de vitamina A, y su posible reversión al administrar ácido retinoico (animales RR), era necesario comprobar que tanto las reservas de vitamina A, en forma de ésteres de retinol, como la forma circulante, el retinol, estaban deplecionadas en estos animales.

Las valoraciones se realizaron por HPLC en todos los casos. En primer lugar se cuantificó el retinol plasmático, siguiendo el método descrito por Arnaud *et al.*, (1991) detallado en el apartado 3 de Métodos. En la Tabla 10 se muestran los valores de la concentración de retinol en el plasma de animales control, VAD y RR. Las ratas alimentadas con dieta exenta de vitamina A desde el nacimiento (a través de la leche materna) hasta los 60 días de vida (dieta AIN 93G sin vitamina A) mostraron una concentración plasmática de vitamina A inferior al 5 % de la concentración del grupo control, siendo los valores muy inferiores al  $0.7 \mu\text{M}$ , considerado por la OMS (Sommer, 1995; Underwood, 2004) en humanos como indicativo de deficiencia de vitamina A, mientras que los niveles de los controles se encontraban dentro de un rango de vitamina A adecuado para ratas (Gardner y Ross, 1993). Cuando los animales deficientes en vitamina A fueron suplementados con ácido retinoico intraperitoneal durante 10 días (RR) los niveles plasmáticos de retinol fueron similares a los del grupo VAD.

A continuación, se procedió a cuantificar la cantidad de retinoides en pulmón. Esperábamos que la caída sufrida en los niveles plasmáticos de retinol en los animales alimentados con dieta VAD se tradujera en una depleción del retinol y de las reservas

de palmitato de retinol en los pulmones. Para comprobarlo, se valoraron por HPLC los retinoides presentes en los extractos obtenidos de muestras de pulmón de los tres grupos de animales, siguiendo el procedimiento descrito por Podda *et al.*, (1999) que aparece detallado en el apartado 3 de Métodos.

La concentración media de retinol y palmitato de retinol, en pulmón por gramo de tejido en los animales control, fue similar a los datos publicados por otros autores, a pesar de la gran variabilidad interindividual descrita (Tabla 10) (Gardner y Ross, 1993). Mientras que los niveles de retinoides en los animales deficientes (VAD y RR) disminuyeron de forma significativa frente al grupo control, representando menos de un 5% del valor obtenido en controles.

	CONTROL	VAD	RR
<b>PLASMA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			
<i>All-trans</i> -retinol	1.73 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
<i>All-trans</i> -palmitato de retinol	N.D.	N.D.	N.D.
<b>PULMÓN (nmol/g de tejido)</b>			
<i>All-trans</i> -retinol	1.13 $\pm$ 0.10	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
<i>All-trans</i> -palmitato de retinol	2.87 $\pm$ 0.59	0.007 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>

**Tabla 10.** Concentraciones de retinol y palmitato de retinol en plasma y pulmón, expresadas en  $\mu\text{M}$  y nmol/g de tejido respectivamente, de animales control, animales VAD y animales VAD tratados con ácido retinoico (RR). Los valores están expresados como la media  $\pm$  SD, N fue 6 animales controles, 7 animales VAD y 4 animales RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a ( $p < 0.05$ ).

No se detectó otro tipo de retinoides, ni tampoco se detectaron carotenoides en el plasma de los diferentes grupos experimentales. La ausencia de carotenoides en plasma está de acuerdo con la composición de la dieta AIN 93G, ya que la única fuente de vitamina A en esta dieta es retinol preformado, y los carotenoides no están incluidos en su composición (para detalles de la composición de la dieta ver sección Material apartado 4 Dietas AIN-93G).

Por otro lado, también se comprobó que los valores de retinoides en el grupo de ratas deficientes pinchadas con vehículo (aceite de girasol) intraperitonealmente, no

diferían de los mostrados por los grupos VAD y RR. En lo sucesivo, para simplificar, no se hará referencia a este grupo si los resultados no lo requieren, ya que el objetivo de su estudio, como ya se ha comentado, fue comprobar que el aceite de girasol no afectaba en modo alguno a la deficiencia de vitamina A, enmascarando los posibles efectos del ácido retinoico sobre ésta.

## **2. Efecto de la deficiencia de vitamina A sobre la composición de la matriz extracelular pulmonar**

En la introducción se ha mencionado como función principal de los pulmones el intercambio gaseoso durante la respiración. También se ha hablado de la amplia distribución de la MEC por el tejido pulmonar y de su alta especialización, tanto a nivel estructural como de composición, para facilitar la ventilación y la difusión de gases en este proceso fisiológico. Por ello, nuestra primera aproximación al efecto de la deficiencia de vitamina A fue el estudio de los cambios sufridos en la composición de colágenos, conjunto de proteínas mayoritarias de la MEC.

### **2.1. Estudio del contenido en colágenos de la matriz extracelular pulmonar**

La cuantificación de los colágenos que componen las MECs del pulmón, incluidas las MBs, se realizó mediante la valoración de hidroxiprolina. La hidroxiprolina es un aminoácido muy abundante en todos los colágenos, y es un buen indicador del contenido total de éstos en un órgano porque ninguna otra proteína lo presenta de forma significativa (Huszar *et al.*, 1980).

La determinación de hidroxiprolina se realizó en extractos de pulmón, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 10 de Métodos. Un fragmento de pulmón de 0.1 g se homogeneizó y tras separar la fracción soluble de la insoluble, esta última donde se encuentra la MEC y la MB, se digirió con colagenasa como se describe en los apartados 8 y 9 de Métodos. Para comprobar que la extracción y digestión con colagenasa fueron eficientes en la solubilización del material colagenoso, y que la valoración era representativa del contenido en colágenos del pulmón, se valoró previamente la hidroxiprolina en las

diferentes fracciones que se obtuvieron (tabla 11). Se puede observar, en este ejemplo representativo, que el material solubilizado por este método representa el 94% del material colagenoso presente originalmente en el pulmón y que en los lavados y el sedimento solo se perdía un 6%. Por tanto, pudimos concluir que este método era un buen sistema de solubilización y de limpieza del material, ya que se eliminaban de la muestra otras proteínas y materiales no deseados.

	mg de colágeno	mg de colágeno/g pulmón	% de colágeno en fracción
<b>Homogenado total</b>	2.0	20	100
Extraído por colagenasa	0.038	0.38	1.9
Fracción insoluble	1.96	19.6	98
<b>Fracción insoluble</b>			
Extraído por colagenasa	1.88	18.8	94
Sedimento post-colagenasa	0.06	0.6	3

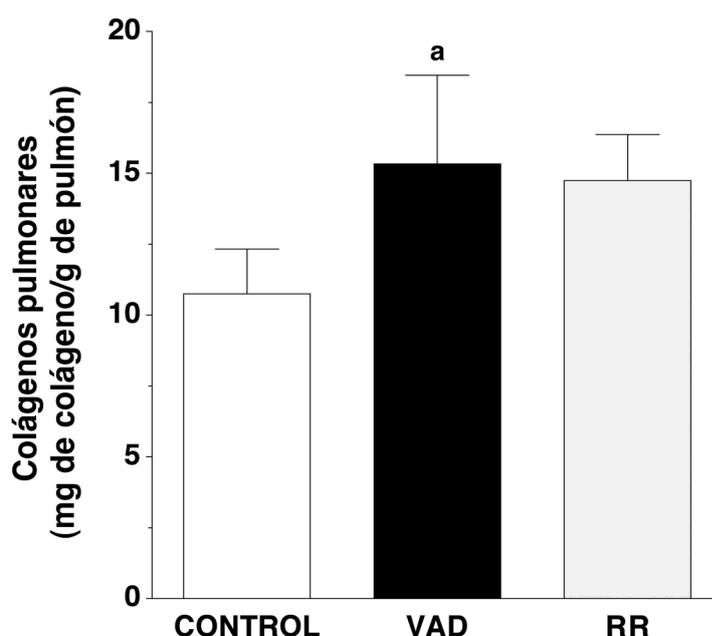
**Tabla 11.** Rendimiento de extracción y solubilización de los colágenos, presentes en el tejido pulmonar, mediante valoración de hidroxiprolina en las fracciones obtenidas. Se muestran los mg de colágeno totales, los mg de colágeno por g de pulmón y el porcentaje de colágeno en cada fracción respecto al homogenado total, para cada una de las fracciones.

Los resultados de hidroxiprolina obtenidos indican que la deficiencia de vitamina A produce un acúmulo, estadísticamente significativo, de colágenos en el pulmón. El incremento fue de un 45% sobre el valor del grupo control, tal y como se puede observar en el histograma de la figura 14. La cantidad de hidroxiprolina encontrada para los controles, medida en mg de colágeno/g de pulmón, fue de  $10.75 \pm 1.58$  frente a los  $15.33 \pm 3.12$  obtenidos para el grupo de ratas VAD.

La administración de ácido retinoico a las ratas VAD no revirtió la acumulación de colágenos en este órgano. El grupo de animales RR presentó valores de hidroxiprolina ( $14.75 \pm 1,62$  mg de colágeno/g de pulmón) similares al grupo VAD y un 37% superiores al grupo control.

Estos resultados indican que la deficiencia de vitamina A produce alteraciones, a nivel molecular, en la composición de la MEC, y además sugiere posibles cambios

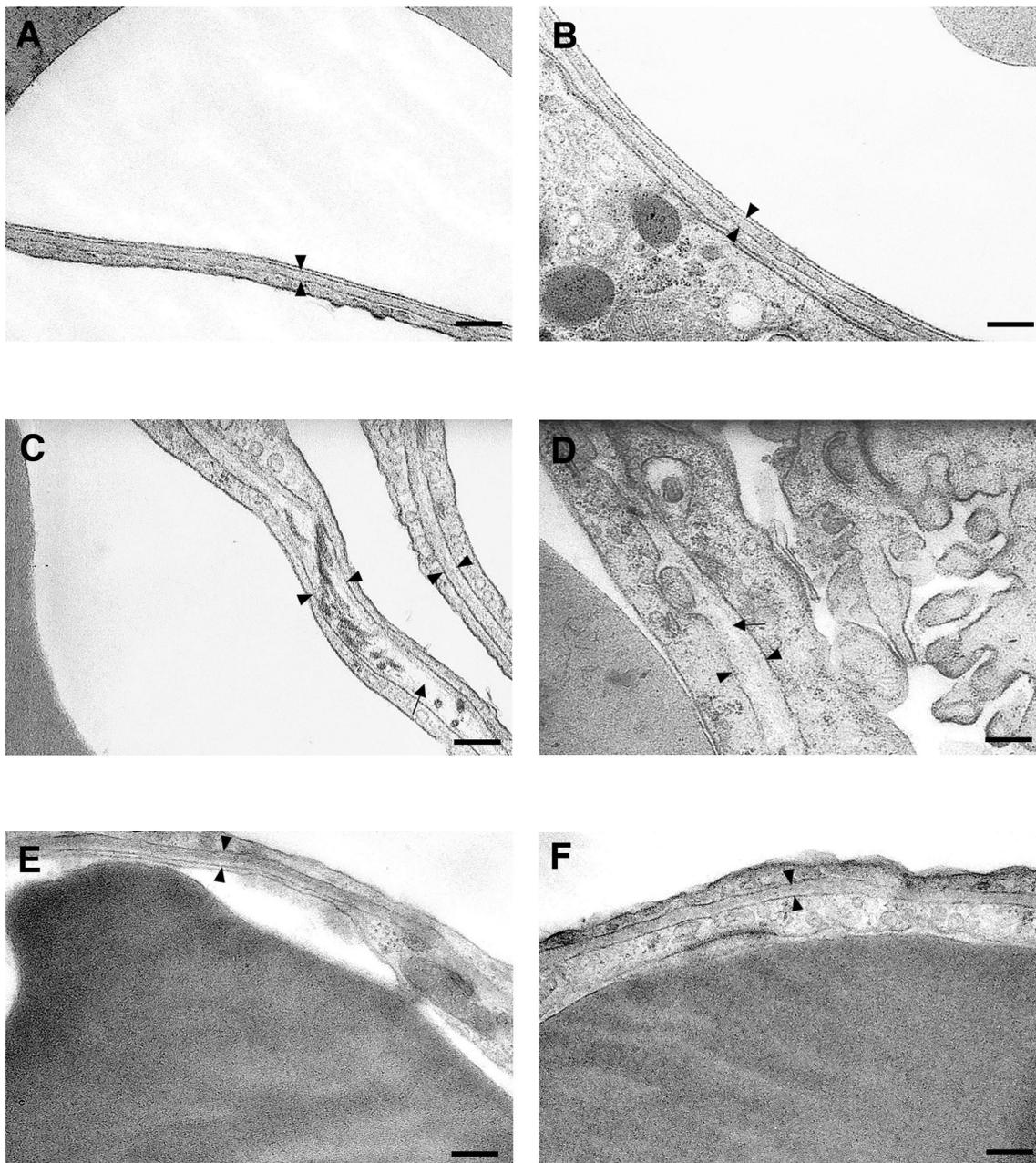
estructurales de la misma. Hay que recordar que en esta determinación valoramos de forma indiscriminada todos los colágenos presentes en el tejido pulmonar, por tanto, para poder tener una visión más detallada de la situación fue necesario estudiar individualmente los colágenos más importantes de este órgano.



**Figura 14.** Valoración del colágeno total pulmonar mediante la cuantificación de hidroxiprolina. Los histogramas muestran la media  $\pm$  SD en mg de colágeno por g de pulmón. El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a ( $p < 0.05$ ).

### 3. Efecto de la deficiencia de vitamina A en la ultraestructura de la membrana basal alveolar

A continuación, decidimos estudiar la ultraestructura pulmonar, centrándonos en la MBA, debido a su alto contenido en colágeno IV y la importancia que tiene en la función de este órgano. El análisis estructural mediante microscopía electrónica reveló que la deficiencia de vitamina A produce importantes alteraciones estructurales en la MBA, y que el tratamiento con ácido retinoico es capaz de mejorarlas.



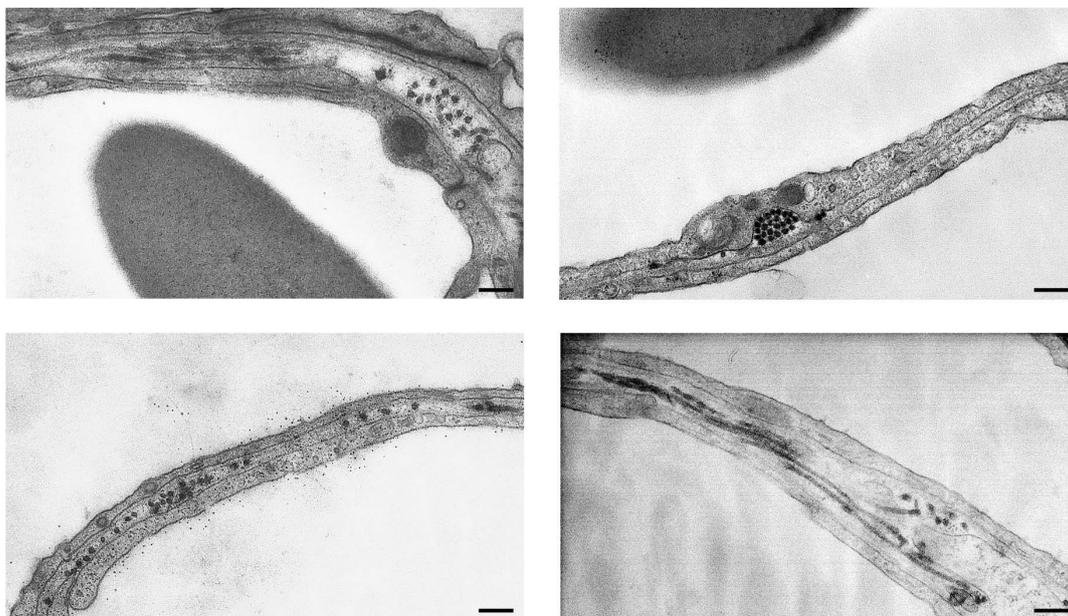
**Figura 15.** Micrografías electrónicas representativas de secciones de pulmón procedentes de animales control (A, B), VAD (C, D) y RR (E, F). Se muestra la zona alveolar del pulmón, en la que aparece señalada entre puntas de flecha (►) la MBA, apreciándose en C y D un engrosamiento y pérdida de uniformidad, acúmulos de fibras de colágeno en las MBs, y con (→) zonas en las que se separa la MB endotelial de la epitelial. Y en las micrografías E y F se aprecia una reducción del tamaño, recuperación de la uniformidad y desaparición de las fibras de colágeno. Barra de escala = 200 nm.

Los animales VAD exhibían una MBA visiblemente engrosada, aunque no de manera uniforme, con respecto a los animales control, cuya MBA presentaba una estructura regular y homogénea. Además, al estudiar el grupo RR se podía constatar que la administración de ácido retinoico a ratas VAD revertía parte del engrosamiento, aproximando el grosor

de la MBA al de los controles, y haciéndola más uniforme, sugiriendo una participación activa de este metabolito de la vitamina A en las alteraciones causadas por la deficiencia.

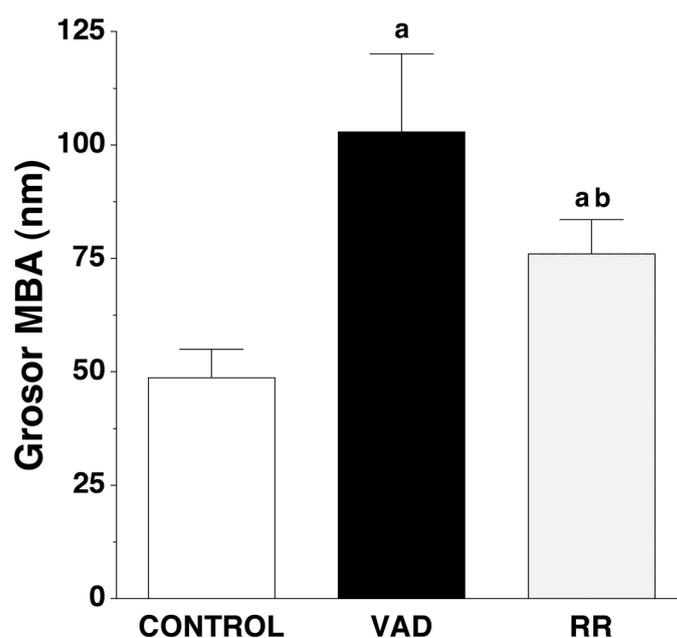
En la figura 15 se pueden observar micrografías de distintas zonas alveolares provenientes de cortes representativos del pulmón de los distintos grupos de estudio. En todas ellas se puede apreciar perfectamente la MBA, delimitada por dos puntas de flecha, una porción de eritrocito, indicando el lumen de los vasos sanguíneos, las células epiteliales o neumocitos tipo I y las células endoteliales.

Otro hallazgo interesante es el que se puede observar en la figura 15 C, micrografía donde aparece el tabique alveolocapilar de un animal VAD con abundantes fibras, de lo que parece colágeno I, irrumpiendo dentro de la MBA. La figura 16 muestra otras micrografías con más ejemplos de estos acúmulos en el interior de la MBA de animales VAD, algo totalmente anómalo ya que este tipo de colágeno no forma parte de la composición y estructura de las MBs, pero ya visto con anterioridad en algunas patologías pulmonares o trasplantes de pulmón (Magro *et al.*, 2005; Magro *et al.*, 2006). Además, también se observan en algunas zonas de la MBA, de los animales VAD, como la MB endotelial se separa de la MB epitelial, y un incremento en el número de caveolas.



**Figura 16.** Detalle de los acúmulos de fibras de colágeno localizados en el interior de la MBA de pulmones procedentes de animales VAD. La observación al microscopio electrónico también permite apreciar una MBA con un aspecto desestructurado y engrosado. Barra de escala = 200 nm.

Las fibras de colágeno que aparecen en el interior de la MBA de animales alimentados con dieta VAD indican un grado de afección severo, ya que este tipo de alteración aparece en enfermedades graves como la fibrosis pulmonar idiopática o esclerosis glomerular (Striker *et al.*, 1984; Ebihara *et al.*, 1993; Magro *et al.*, 2006). En algunos casos las fibras aparecen muy próximas a las células endoteliales, incluso parecen emerger de ellas, lo que nos hace pensar que son estas células las que sintetizan las fibras como respuesta a algún estímulo por la falta de vitamina A. Lo más interesante es la prácticamente completa desaparición de estos depósitos al tratar los animales deficientes con ácido retinoico. Así como en el grupo VAD estos depósitos aparecen abundantemente, en el grupo RR resulta complicado encontrarlos.



**Figura 17.** Medida del grosor de la MBA. Los histogramas muestran las medias  $\pm$  SD en nm, de los grosores determinados en la MBA de pulmones de animales control, VAD y RR. Las mediciones se realizaron sobre micrografías según se indica en el apartado 17 de Métodos, utilizando al menos 30 por grupo experimental. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

Tras realizar mediciones del grosor de la MBA, a lo largo de su estructura en diferentes micrografías, podemos decir que el grosor de la MBA es el doble en los animales

VAD que en los animales controles (controles  $48.69 \pm 6.30$  nm, VAD  $102.85 \pm 17,22$  nm;  $p < 0.05$ ). Mientras que al administrar ácido retinoico a los animales deficientes, esta diferencia se redujo aproximadamente a la mitad (RR  $75.97 \pm 7.59$  nm;  $p < 0.05$ ) siendo estadísticamente diferente tanto del grupo control como del grupo VAD (Figura 17). Puede que estos resultados muestren unas alteraciones estructurales en parte irreversibles o que el tratamiento con ácido retinoico no alcanzó el tiempo necesario para revertirlas.

#### **4. Efecto de la deficiencia de vitamina A en la composición de la membrana basal alveolar**

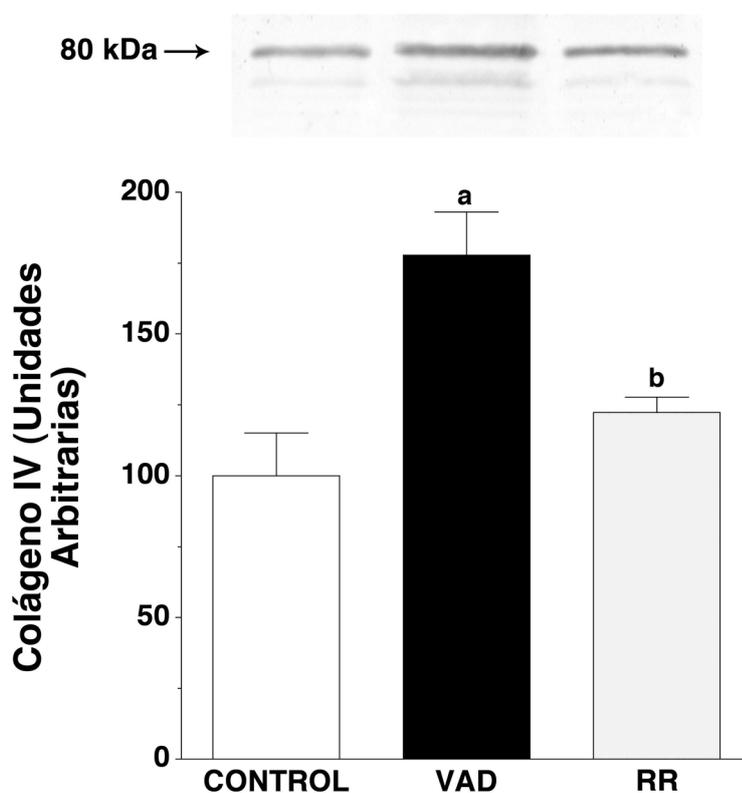
La deficiencia de vitamina A produjo cambios en la estructura de la MBA, como pudimos comprobar al observarla al microscopio electrónico, y además descubrimos que se producían deposiciones de colágenos en el pulmón, ya que la hidroxipolina estaba incrementada en el grupo de animales VAD. Por lo que, a continuación decidimos analizar la composición de la MBA.

Como ya se comentó en el apartado de introducción, los principales componentes proteicos de las MBs son el colágeno IV y la laminina, que acompañados de la entactina y de proteoglicanos completan su estructura. Para valorar si la privación en vitamina A de la dieta influía en la composición de la MBA, centramos nuestros estudios en los componentes mayoritarios, el colágeno IV y la laminina, tanto en el contenido como en su composición.

Los estudios sobre la composición de la MBA se realizaron en muestras extraídas de pulmón, que posteriormente fueron digeridas con colagenasa para solubilizar los componentes que integran la MEC, tal y como se detalla en los apartados 8 y 9 de Métodos. El análisis de las distintas proteínas se llevó a cabo mediante inmunoblot, primero se valoró el colágeno IV en su totalidad, y posteriormente se valoraron las distintas cadenas que lo componen. En el caso de la laminina, analizamos algunas de las cadenas que forman las lamininas más abundantes en el pulmón de rata adulta, ya que es una molécula compuesta por 9 cadenas que forman 15 isoformas que se conozcan, y con un patrón de expresión para cada una de ellas muy complejo, tanto en el tiempo como en la distribución (Miner y Yurchenco 2004).

#### 4.1. Estudio del contenido en colágeno IV

El análisis mediante inmunoblot mostró un incremento del 78% en la cantidad de colágeno IV presente en la MBA de animales VAD con respecto a los controles, en concordancia con el engrosamiento de la MBA y la hidroxiprolina pulmonar. Interesantemente, el tratamiento con ácido retinoico redujo significativamente los niveles de colágeno IV en el grupo RR, alcanzando prácticamente los de las ratas control, y no encontrando diferencias significativas entre estos dos grupos (Figura 18).



**Figura 18.** Cuantificación por Western blotting del colágeno IV pulmonar. Los histogramas muestran, en unidades arbitrarias, la media  $\pm$  SD de los resultados obtenidos al densitometrar la banda acumulada de 80 kDa, de la que se muestra un ejemplo representativo de cada grupo. El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

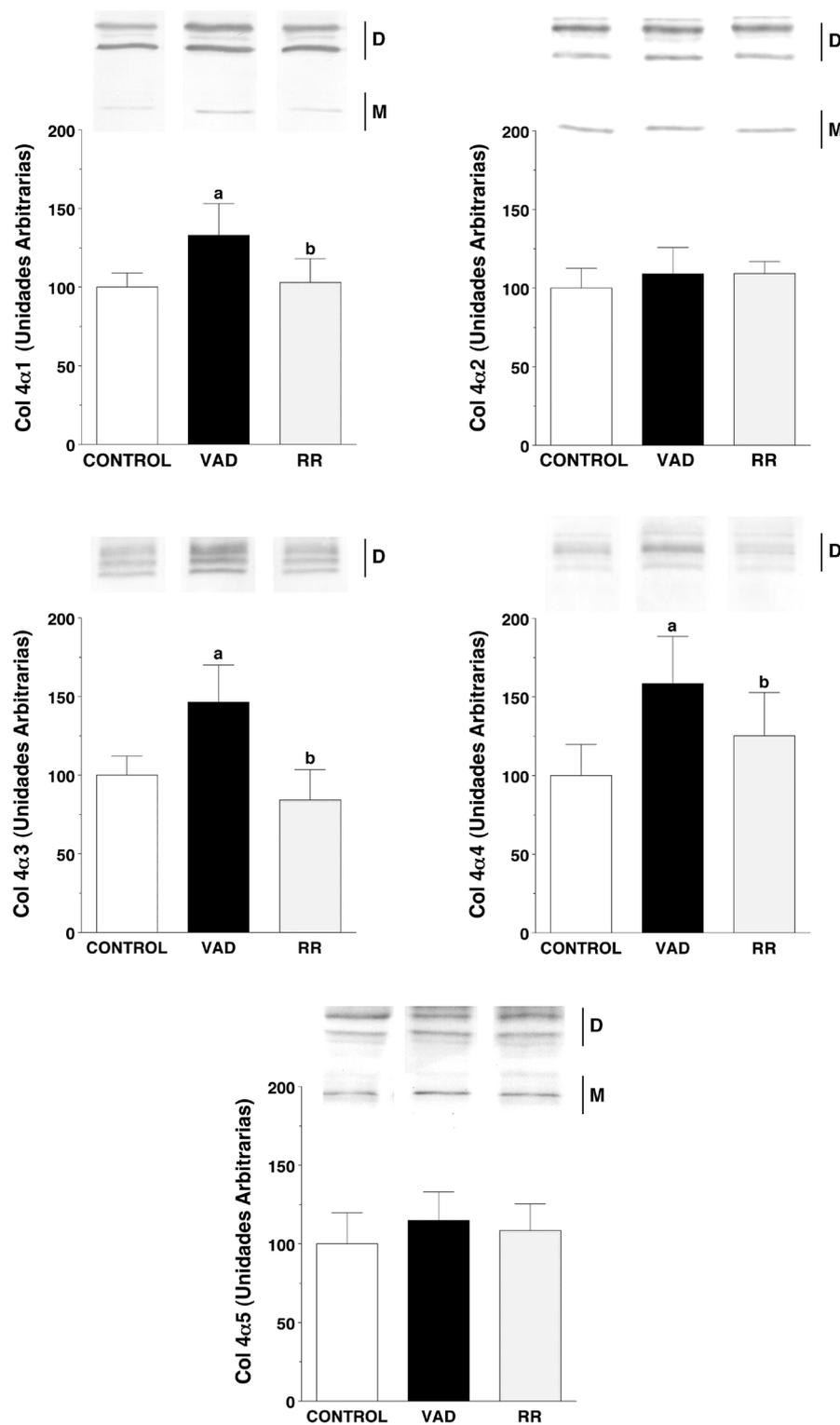
## 4.2. Estudio de la composición de la molécula de colágeno IV

En vista de los resultados obtenidos para el colágeno IV alveolar, lo siguiente que nos propusimos estudiar fue el efecto de la deficiencia de esta vitamina en la composición de cadenas  $\alpha$  del colágeno IV. Se realizaron inmunoblots para todas las cadenas y la única que no se inmunodetectó fue  $\alpha 6(\text{IV})$ , de acuerdo con lo descrito ya que no se expresa en el pulmón, salvo en el epitelio bronquial en pequeña proporción (Hudson *et al.*, 2003). En los Western blot fue posible identificar las bandas correspondientes a los fragmentos monoméricos de sus dominios no colagenosos, así como las bandas correspondientes a los dímeros que estos fragmentos forman. En algún caso también se detectaron bandas correspondientes a trímeros.

Los cambios observados no son iguales para todas las cadenas, hay diferencias a nivel cuantitativo, ya que las variaciones para algunas cadenas son mayores que para otras con respecto a los controles, y además esas diferencias varían cualitativamente, ya que sorprendentemente unas cadenas aumentan su contenido, mientras que otras no varían con respecto a las muestras procedentes de animales control.

La figura 19 muestra los histogramas de los valores obtenidos al densitometrar las bandas pertenecientes a los dímeros y monómeros de las cadenas  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 5(\text{IV})$ . En ella vemos que el contenido en la cadena  $\alpha 1(\text{IV})$  fue un 33% mayor en las muestras procedentes de animales sometidos a dieta VAD que en los controles, mientras que  $\alpha 2(\text{IV})$  no varió su contenido con respecto al control. El contenido de la cadena  $\alpha 3(\text{IV})$  y  $\alpha 4(\text{IV})$  en las muestras procedentes de animales VAD aumento un 46% y un 58% con respecto al control, y finalmente el contenido de la cadena  $\alpha 5(\text{IV})$  permaneció similar en ambos grupos. Las diferencias observadas en  $\alpha 1(\text{IV})$ ,  $\alpha 3(\text{IV})$  y  $\alpha 4(\text{IV})$  entre animales control y VAD son estadísticamente significativas.

Al igual que ocurría con el contenido total de colágeno IV pulmonar, las cadenas  $\alpha(\text{IV})$  que aumentan en la deficiencia de vitamina A,  $\alpha 1(\text{IV})$ ,  $\alpha 3(\text{IV})$  y  $\alpha 4(\text{IV})$ , se recuperan al administrar ácido retinoico a las ratas. Las diferencias en estas tres cadenas entre el grupo VAD y RR son estadísticamente significativas, pero no lo son entre el grupo RR y control.



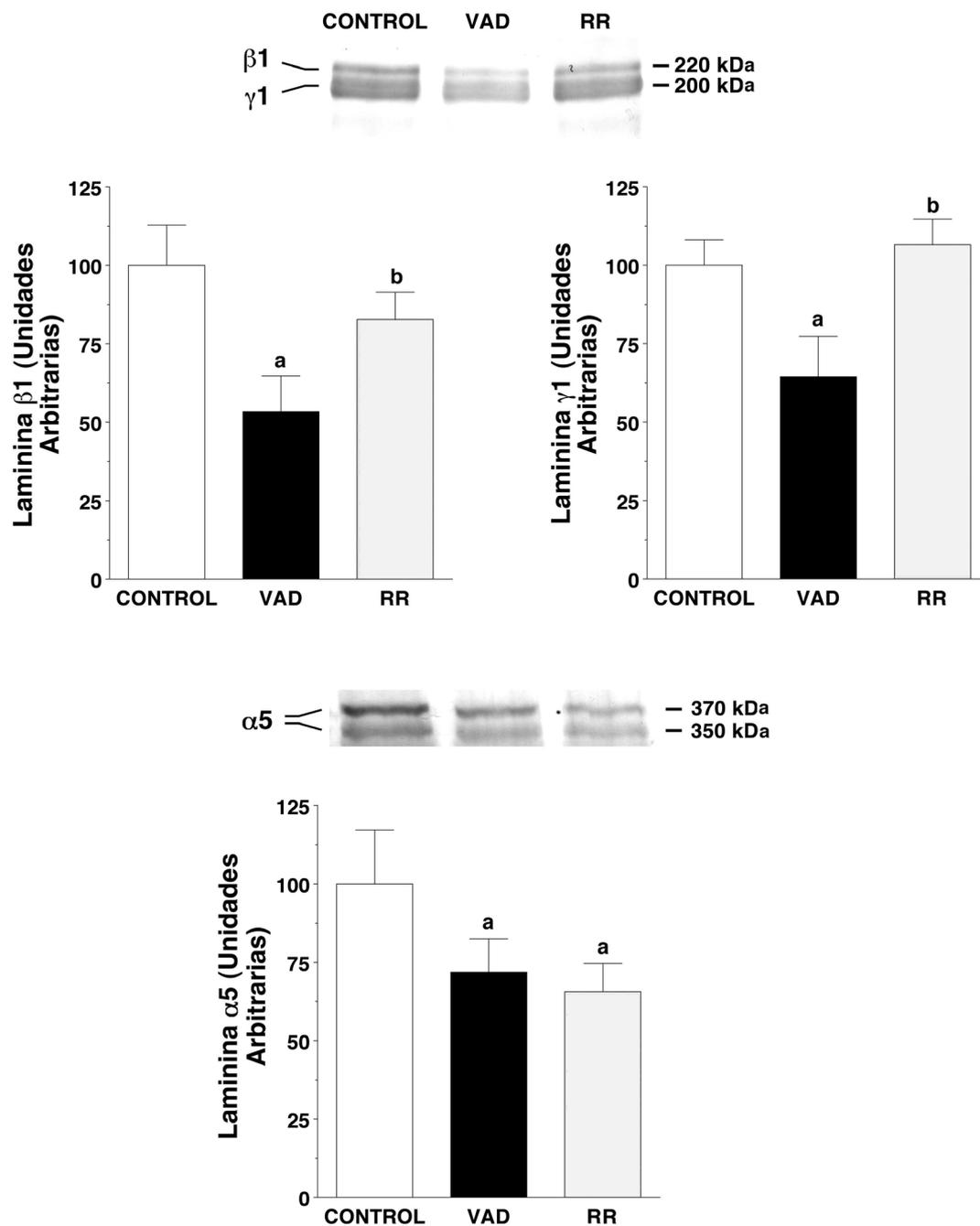
**Figura 19.** Cuantificación por Western blotting de las cadenas  $\alpha$  del colágeno IV. Los histogramas muestran, en unidades arbitrarias, la media  $\pm$  SD de los resultados obtenidos al densitometrar las bandas de dímeros (D) y monómeros (M), de las que se muestra un ejemplo representativo. El número de animales fue 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Estudio del contenido de cadenas de laminina

La laminina, como ya se ha comentado, es la molécula no colagenosa más abundante de las MBs y desempeña un papel de gran importancia en el ensamblaje y la estructuración de las mismas. Por su importancia y por los cambios estructurales observados hasta el momento en la MBA analizamos el contenido pulmonar en las cadenas laminina  $\beta 1$ , laminina  $\gamma 1$  y laminina  $\alpha 5$ . Se decidió estudiar las cadenas de laminina  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  para obtener una valoración general de las lamininas, ya que al menos una de las dos se encuentra presente en todas las lamininas salvo en tres, la laminina 5 ( $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  y  $\gamma 2$ ), la laminina 14 ( $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 3$ ) y la laminina 15 ( $\alpha 5$ ,  $\beta 3$  y  $\gamma 3$ ). Y la cadena de laminina  $\alpha 5$  se eligió por estar presente en la laminina 10 ( $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ ) y la laminina 11 ( $\alpha 5$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 1$ ), que tienen una gran importancia en la estructuración de las MBs pulmonares al final del desarrollo y durante la etapa adulta (Nguyen y Senior, 2006).

El análisis de las bandas obtenidas en los Western blot para la laminina  $\beta 1$  y laminina  $\gamma 1$  mostraron una menor intensidad en el caso de las muestras procedentes de animales sometidos a la dieta VAD y tras cuantificar permitió concluir, que como media, estas lamininas disminuían en un 50% y un 40% respectivamente con respecto a las muestras control, siendo las diferencias estadísticamente significativas. El efecto de la privación de vitamina A sobre las lamininas fue en sentido contrario al sufrido por el colágeno IV, poniendo de manifiesto la complejidad de sus efectos sobre la composición de las MBs pulmonares. De nuevo, al tratar los animales VAD con ácido retinoico se revirtieron parte de los efectos en la laminina  $\beta 1$ , alcanzando un 83% del control, y completamente en la laminina  $\gamma 1$  (Figura 20).

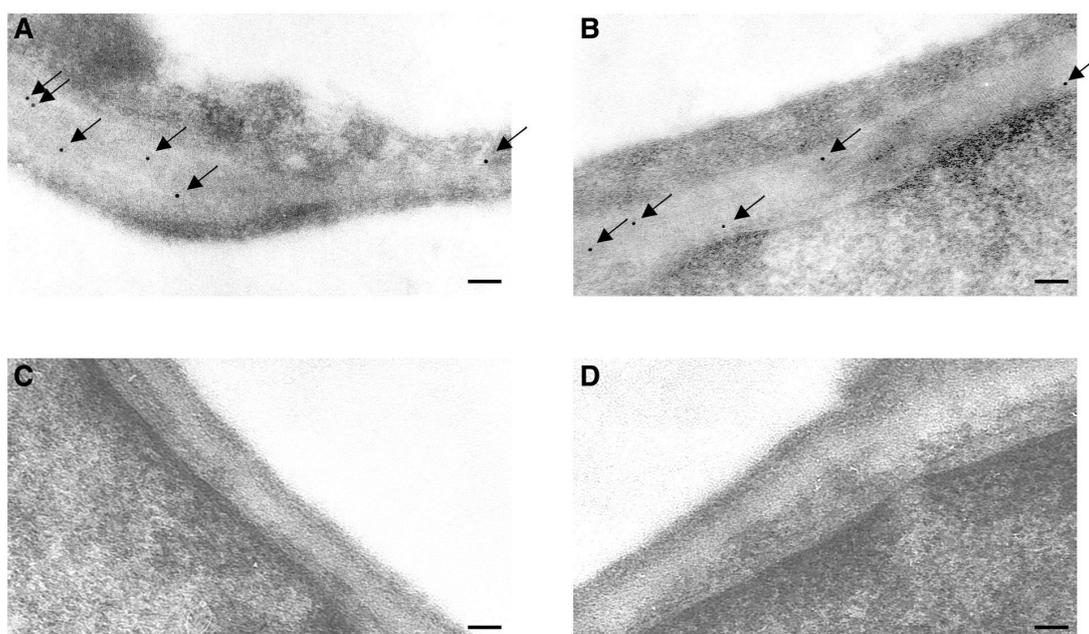
La laminina  $\alpha 5$ , que aparece como un doblete que migra a 350-370 kDa, en SDS-PAGE en condiciones reductoras, corresponden a la forma desglicosilada y glicosilada de la cadena (Tiger *et al.*, 1997; Kikkawa *et al.*, 1998 ;Champlaud *et al.*, 2000) sufrió también una disminución de su contenido, un 40% menos en los animales VAD que en los controles, diferencia estadísticamente significativa. Y al administrar ácido retinoico no se recuperaron los valores, siendo un 45% inferior que el control, e indicando una tendencia en el grupo RR a continuar disminuyendo. Una respuesta un tanto sorprendente, ya que hasta el momento el ácido retinoico había sido capaz de revertir casi todos los efectos causados por la deficiencia de vitamina A.



**Figura 20.** Cuantificación por Western blotting de las cadenas laminina  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$  y  $\alpha 5$ . Los histogramas muestran, en unidades arbitrarias, la media  $\pm$  SD de los resultados obtenidos al densitometrar las bandas detectadas a 220 kDa y 200 kDa, para las lamininas  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ , y 370 kDa y 350 kDa para la laminina  $\alpha 5$ , de las que se muestra un ejemplo representativo. El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4. Estudio de las deposiciones de colágeno en la membrana basal alveolar

Ya hemos visto cómo en el interior de la MBA de animales alimentados con dieta VAD aparecían fibras de colágeno. Estas fibras se presentaban de forma desordenada emergiendo aparentemente de las células endoteliales e irrumpiendo en la estructura de la MB. En este sentido, se ha descrito que en ciertos estados patológicos, como la fibrosis pulmonar idiopática o el síndrome bronquiolitis obliterans (BOS), resultado del rechazo crónico del trasplante de pulmón, las células endoteliales sufren una activación como respuesta a un proceso inflamatorio o lesivo, y pueden sintetizar y depositar fibras de colágeno de tipo intersticial en el interior de la MBA, habiendo una correlación entre la aparición de estos depósitos y un pronóstico negativo de estas enfermedades (Magro *et al.*, 2005; Magro *et al.*, 2006).



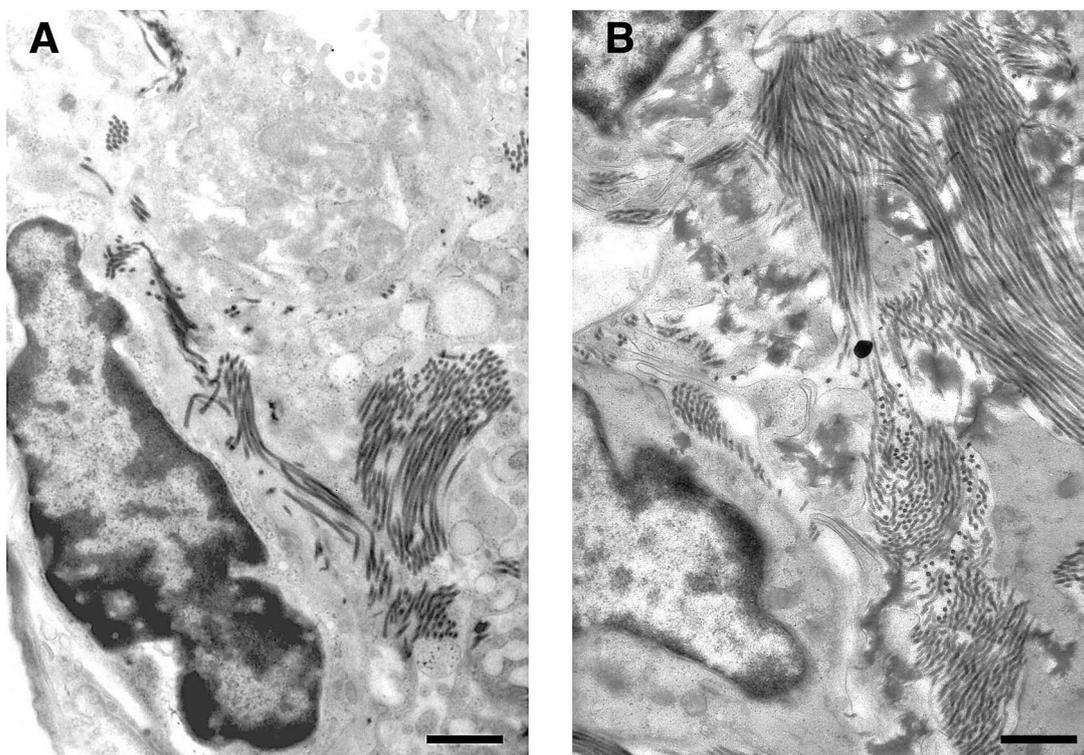
**Figura 21.** Inmunocitoquímica para colágeno I sobre secciones de pulmón procedentes de animales VAD (A, B), control (C) y RR (D). En las micrografías aparece la MBA, y en el interior de su estructura, en los animales VAD, se localizan partículas de oro coloidal señaladas por flechas, mientras que en los animales control y RR no se aprecia ninguna partícula de oro. Barra de escala = 75 nm.

El aspecto que ofrecían estas fibras al observarlas a microscopio electrónico, hacían suponer que se trataba de colágeno I. Se hicieron medidas del diámetro de las fibras que aparecían en el interior de la MBA y del colágeno I intersticial, obteniéndose valores prácticamente idénticos (colágeno I intersticial  $47.59 \pm 2.88$  nm, colágeno de la MBA  $45.55 \pm 4.03$  nm). Para comprobar que efectivamente se trataban de fibras de colágeno I se realizó una inmunocitoquímica, incubando secciones ultrafinas de pulmón de muestras procedentes de animales control y alimentados con dieta VAD en una dilución adecuada de un anticuerpo frente a dicha molécula, y posteriormente con su correspondiente anticuerpo secundario, marcado con partículas de oro coloidal, según se describe en el apartado 18 de Métodos. La observación de las secciones permitió localizar partículas de oro coloidal en el interior de la estructura de la MBA de animales VAD, que no eran visibles en los controles ni en los RR, lo que suponía una reacción positiva para el colágeno I (Figura 21).

## **5. Efecto de la deficiencia de vitamina A en el colágeno I pulmonar**

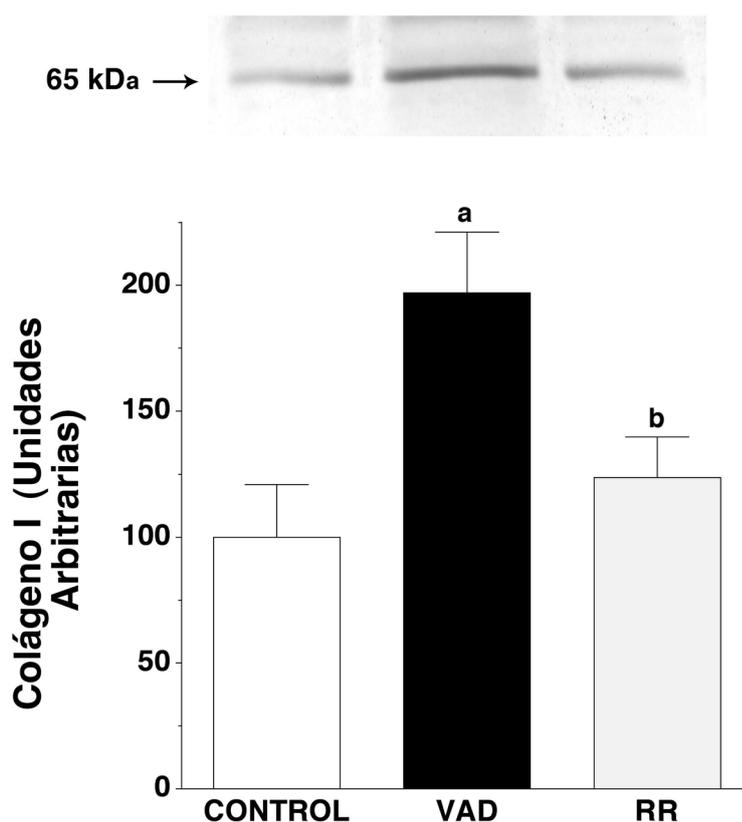
La deposición de fibras de colágeno I en el interior de la MBA es algo totalmente anómalo, y da indicios de una posible desregulación de la expresión del colágeno I intersticial. Para comprobar si estábamos en lo cierto estudiamos el efecto de la deficiencia de vitamina A en la distribución y el contenido de este colágeno en la MEC pulmonar. Realizamos fotos de la MEC pulmonar (Figura 22) e inmunoblots con anticuerpos anti colágeno I del material solubilizado por la colagenasa en homogenados de pulmón, tal y como se describe en el apartado 8 y 9 de Métodos (Figura 23).

Además de aparecer fibrillas de colágeno en el interior de la MB, el colágeno intersticial de la MEC anexa aparecía más abundantemente y distribuido de forma desorganizada, formando acúmulos de fibrillas en los animales VAD (Figura 22 B). Estas observaciones no se hallaron en las muestras control, donde también se localizaban fibras de colágeno, dado que es el principal componente de la MEC, pero claramente en menor cantidad. Los animales deficientes en vitamina A recuperados con ácido retinoico mostraron un ultraestructura más parecida a los animales control que a los VAD.



**Figura 22.** Detalle del colágeno intersticial de pulmones procedentes de animales control (A) y alimentados con dieta VAD (B). Las micrografías permiten apreciar grandes acúmulos de fibrillas de colágeno en los animales VAD con respecto a los controles. Barra de escala = 1  $\mu$ m.

Las bandas identificadas inmunológicamente como colágeno I, tanto en las muestras pulmonares como en colágeno I de cola de rata comercial, y tras comprobar que se acumulaban a tiempos crecientes de digestión con colagenasa, se densitometraron y analizaron. Los resultados obtenidos, expuestos en forma de histograma en la figura 23, muestran un contenido de colágeno I en los pulmones de animales VAD el doble que en animales control. El tratamiento con ácido retinoico recuperó casi por completo los valores controles, quedando únicamente un 25% por encima del control pero sin que hubieran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.



**Figura 23.** Cuantificación por Western blotting del colágeno I pulmonar. Los histogramas muestran, en unidades arbitrarias, la media  $\pm$  SD de los resultados obtenidos al densitometrar las bandas acumuladas a 65 kDa, de las que se muestra un ejemplo representativo. El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

## 6. Efecto de la deficiencia de vitamina A en la expresión génica de distintos componentes de la membrana basal y matriz extracelular pulmonar

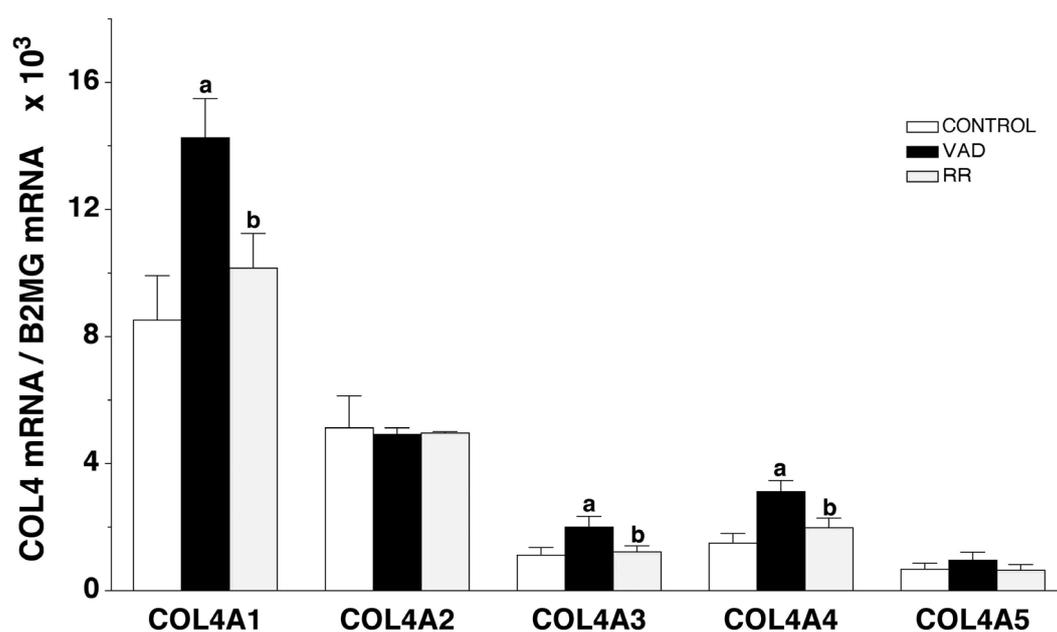
Una vez estudiadas y analizadas las alteraciones sobre la estructura y composición de la MB y del colágeno I intersticial en la deficiencia de vitamina A, profundizamos en los mecanismos moleculares que las causan. Evaluamos el contenido de los mRNAs que codifican para las distintas proteínas estudiadas hasta el momento, y así poder tener una idea sobre el origen transcripcional y/o traduccional de los cambios observados.

El estudio de la cuantificación génica de las cadenas  $\alpha$  del colágeno IV, las cadenas laminina  $\beta$ 1, laminina  $\gamma$ 1 y laminina  $\alpha$ 5, y las cadenas  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 del colágeno I, se completó con las cadenas laminina  $\alpha$ 2 y laminina  $\alpha$ 4, y la cadena  $\alpha$ 1 del colágeno III, con el fin de tener más datos de otros componentes de la MB y la MEC, y poder comprender mejor qué ocurre en la deficiencia de vitamina A. Todas las medidas se realizaron mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real y se utilizó la  $\beta$ -2microglobulina como gen control. Por ello, en primer lugar, se comprobó que los niveles de expresión de la  $\beta$ -2microglobulina no presentaban variaciones en los diversos grupos de estudio, lo que permitía utilizarlo como gen de referencia. Así, los valores de mRNA de los genes analizados se representan como el cociente entre las copias de mRNA del gen en estudio y las de la  $\beta$ -2microglobulina.

### **6.1. Análisis del contenido de mRNA para las cadenas $\alpha$ del colágeno IV**

Los resultados obtenidos fueron cualitativamente similares a los obtenidos al analizar el contenido proteico. Como muestra la figura 24, la dieta VAD induce cambios en el contenido de mRNA para las cadenas  $\alpha$ (IV), así la cadena  $\alpha$ 1(IV) presenta un aumento en el contenido de mRNA de más de un 65% con respecto a los controles, mientras que en el caso de la cadena  $\alpha$ 2 su mRNA no varía. Y de manera similar a lo que sucedía con el contenido proteico, el contenido en mRNA para las cadenas  $\alpha$ 3 y  $\alpha$ 4 aparece aumentado dos veces en los animales VAD con respecto a los controles. Finalmente el mRNA para la cadena  $\alpha$ 5 aumenta en el grupo VAD, pero no de forma significativa, y el mRNA de la cadena  $\alpha$ 6 no se estudio ya que únicamente se expresa, en pequeña proporción, en el epitlio bronquial.

El tratamiento con ácido retinoico inhibió la transcripción de las cadenas del colágeno IV incrementadas en la deficiencia, recuperando prácticamente los valores de los controles. La cantidad de mRNA de las cadenas  $\alpha$ 1(IV),  $\alpha$ 3(IV) y  $\alpha$ 4(IV) en el grupo RR no difería estadísticamente de los controles, y la de las cadenas  $\alpha$ 2(IV) y  $\alpha$ 5(IV) no difería ni de los controles ni de los animales VAD (Figura 24).

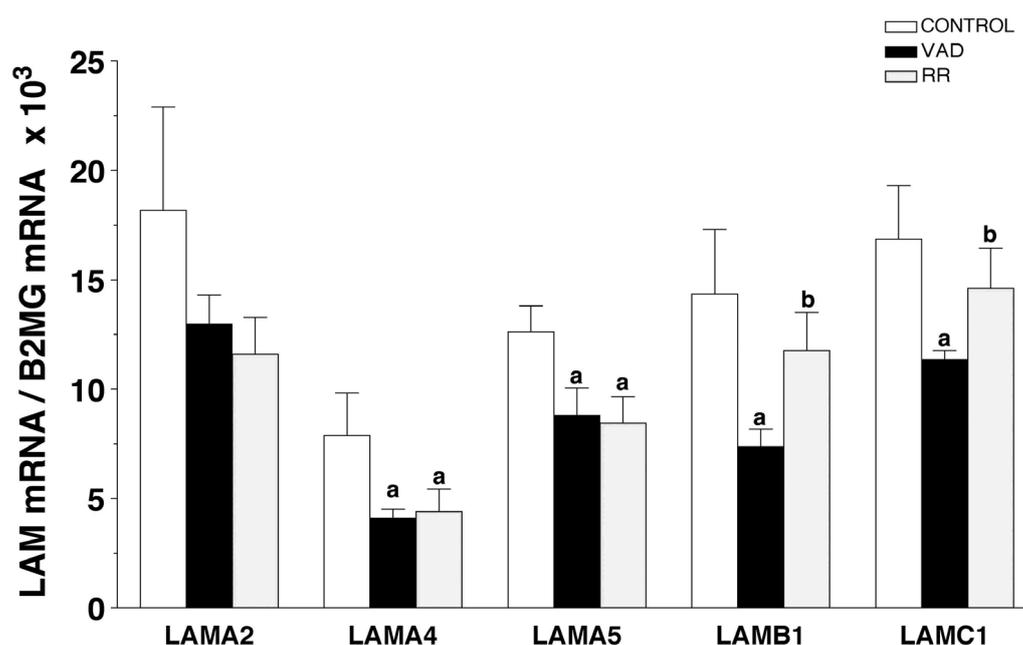


**Figura 24.** Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de mRNA de las cadenas  $\alpha(IV)$ . Los histogramas muestran la media  $\pm$  SEM de los niveles de mRNA de cada cadena  $\alpha(IV)$  con respecto al gen de referencia (B2MG). El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

## 6.2. Análisis del contenido de mRNA para las cadenas de laminina

Al igual que ocurría en las cadenas  $\alpha$  del colágeno IV, las cantidades de mRNA para las cadenas de laminina fueron cualitativamente similares a las obtenidas al analizar el contenido proteico.

Como se puede observar en la figura 25, en la que se muestran los histogramas de las cuantificaciones de mRNAs para algunas cadenas de laminina, la deficiencia de vitamina A produce una caída de la transcripción de los genes que codifican para estas cadenas. Concretamente en el grupo VAD, respecto al grupo control, las cadenas laminina  $\alpha_2$ , laminina  $\alpha_4$  y laminina  $\alpha_5$  disminuyen un 30%, un 48% y un 31% respectivamente, y las cadenas laminina  $\beta_1$  y laminina  $\gamma_1$  disminuyen un 50% y un 33%.



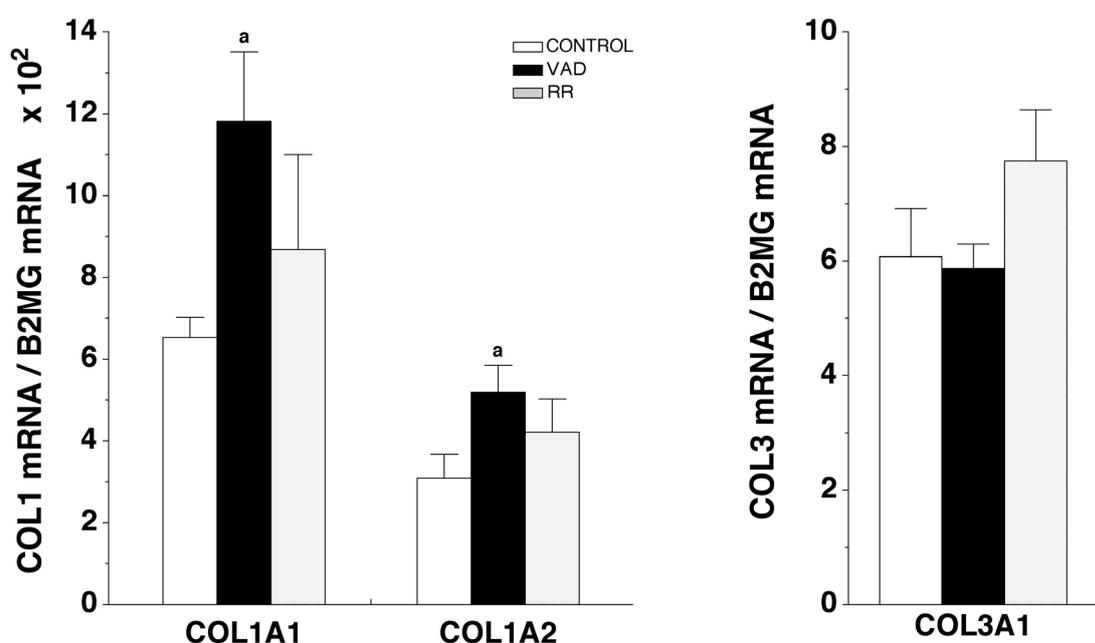
**Figura 25.** Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de mRNA de las cadenas de laminina  $\alpha$ 2 (LAMA2), laminina  $\alpha$ 4 (LAMA4), laminina  $\alpha$ 5 (LAMA5), laminina  $\beta$ 1 (LAMB1) y laminina  $\gamma$ 1 (LAMC1). Los histogramas muestran la media  $\pm$  SEM de los niveles de mRNA de las cadenas de laminina con respecto al gen de referencia (B2MG). El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

En vista de los resultados obtenidos para el grupo RR podemos decir que el ácido retinoico activa la transcripción, en los animales deficientes, de la laminina  $\beta$ 1 y la laminina  $\gamma$ 1, ya que se recuperan parcialmente sus niveles (82% y 87% del control). Pero no modifica los niveles de mRNA de la laminina  $\alpha$ 2, la laminina  $\alpha$ 4 y la laminina  $\alpha$ 5 en estos animales.

El estudio de los genes de las cadenas de laminina, junto con el de las cadenas  $\alpha$  del colágeno IV demuestra que las alteraciones en la composición de la MBA, o al menos una gran parte de ellas, son de origen transcripcional ya que correlacionan perfectamente los niveles de mRNA con los de proteína.

### 6.3. Análisis del contenido de mRNA de las cadenas $\alpha$ del colágeno I y del colágeno III

Finalmente, analizamos la expresión génica de las cadenas que componen los colágenos intersticiales mayoritarios, es decir, el colágeno I y el colágeno III. La aparición de fibras de colágeno I en el interior de la MBA y el incremento de las deposiciones de colágeno I, en el pulmón de animales deficientes, es probable que fuera debido a un efecto transcripcional y por lo tanto los niveles de mensajeros deberían estar aumentados también.



**Figura 26.** Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de mRNA de las cadenas de colágeno  $\alpha 1(I)$  (COL1A1),  $\alpha 2(I)$  (COL1A2) y  $\alpha 1(III)$  (COL3A1). Los histogramas muestran la media  $\pm$  SEM de los niveles de mRNA de cada cadena  $\alpha(I)$  y  $\alpha(III)$  con respecto al gen de referencia (B2MG). El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

Como se puede apreciar en la figura 26 los mRNAs para las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del colágeno I aumentaron prácticamente al doble en la deficiencia de vitamina A. Exactamente, el incremento con respecto a los controles fue de un 81% para  $\alpha 1$  y un 73% para  $\alpha 2$ , siendo las diferencias estadísticamente significativas. El tratamiento con ácido retinoico redujo los niveles de mensajero de las dos cadenas del colágeno I quedando

un 33%  $\alpha 1$  y 37%  $\alpha 2$  por encima del grupo control, aunque las diferencias no fueron significativas con respecto a los otros dos grupos existe una clara tendencia a recuperar los valores normales del control.

En el caso de la cadena  $\alpha 1$  del colágeno III los niveles de mRNA no presentaron diferencias significativas entre los distintos grupos, únicamente se apreció un incremento estadísticamente no significativo de alrededor de un 30% en el caso de los animales pinchados con ácido retinoico respecto a los controles. Este hecho podría sugerir una leve activación de la transcripción de esta cadena por el ácido retinoico y explicar los valores elevados de hidroxipolina en este grupo.

## **7. Efecto de la deficiencia de vitamina A en las metaloproteasas de matriz y sus inhibidores**

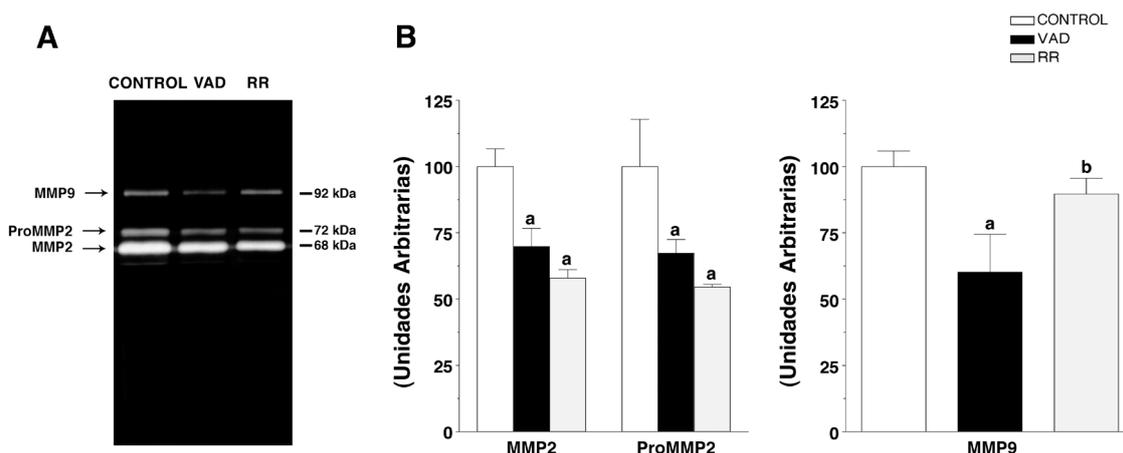
En la introducción se habló de lo complejo que es el proceso de degradación de la MB, y la importancia que tiene su renovación para una correcta estructuración y funcionamiento. En vista de las alteraciones en la estructura y composición de la MB en la deficiencia de vitamina A, es probable que de alguna manera las actividades proteolíticas de las metaloproteasas encargadas de degradarla estén modificadas.

Hemos comprobado que las cantidades relativas de las proteínas mayoritarias de la MBA, en todos los grupos de animales, eran proporcionales a las cantidades de mRNA. Pero, se hace necesario valorar las actividades enzimáticas de las MMPs (MMP2 y MMP9) dado que también pueden participar en las alteraciones estructurales y en los depósitos y acúmulos de colágenos. Esta participación podría ser bien como consecuencia directa de la deficiencia o como respuesta a las alteraciones en la composición ocasionadas por la deficiencia.

En este sentido, también estudiamos la posible implicación de los TIMP (Inhibidores tisulares de metaloproteasas) en la regulación de la actividad de las MMPs. Así, mediante inmunoblot comparamos las cantidades relativas de TIMP1 y TIMP2 en los distintos grupos.

### 7.1. Estudio de la actividad proteolítica de las metaloproteasas de matriz mediante zimografía

La actividad de las MMPs se estudió en la fracción soluble del pulmón, obtenida al homogeneizar y extraer con triton X-100 las muestras de pulmón procedentes de animales control, VAD y RR, y analizándose por zimografía. Primero se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida que contenían gelatina (1 mg/ml) como sustrato, y en unas condiciones determinadas para preservar en lo posible la actividad enzimática de las MMPs (apartado 13 de Métodos). Tras incubar el gel en los tampones correspondientes y a la temperatura adecuada, tal y como se indica en el apartado 13 de Métodos, se tiñó con azul de coomassie apareciendo unas bandas claras indicativas de que los enzimas habían actuado degradando la gelatina.



**Figura 27.** Cuantificación mediante zimografía de la MMP2 y la MMP9. A) Zimografía representativa de muestras procedentes de animales control, VAD y RR. Las bandas claras indican el grado de actividad proteolítica de ambas enzimas, la MMP2 y la MMP9, y de la pro-MMP2. B) Los histogramas muestran, en unidades arbitrarias, la media  $\pm$  SD de los resultados obtenidos al densitometrar las bandas detectadas. El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

La figura 27 A muestra una zimografía en la que son apreciables en cada calle 3 bandas claras, al compararlas con los patrones de peso molecular se vio que correspondían a los pesos esperados para la MMP2 (68 kDa), la pro-MMP2 (72 kDa) y la MMP9 (92 kDa). Además se utilizaron MMPs comerciales para poder estar seguros de la identidad de las bandas observadas.

Tras hacer el densitometrado de las bandas, nuestros resultados demostraron que existía una disminución en la actividad de ambas metaloproteasas. De tal manera que en los animales alimentados con la dieta VAD la MMP2 y la pro-MMP2 aparecían disminuidas en un 30%, y la MMP9 en un 40% con respecto a los animales control (Figura 27 B).

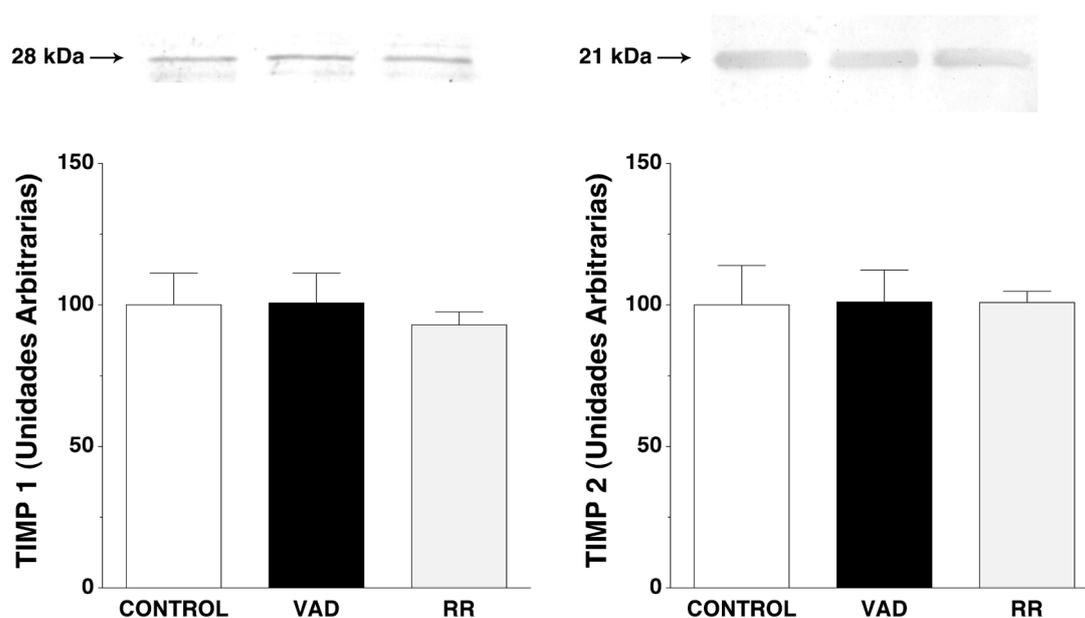
Curiosamente el ácido retinoico era capaz de nivelar la actividad de la MMP9 en los animales RR hasta equilibrarla a la de los controles, sin que hubiera diferencias significativas entre ellos, pero no era capaz de hacerlo en el caso de la MMP2 y la pro-MMP2, que continuaban perdiendo actividad en relación a los controles (Figura 27 B).

Estos resultados parecen indicar, que en las ratas deficientes en vitamina A la disminución de las MMPs puede también contribuir a las alteraciones estructurales y de composición de las MBAs, pudiendo acelerar la aparición de síntomas clínicos.

## **7.2. Estudio mediante Western Blot de Inhibidores tisulares de metaloproteasas**

Como hemos visto en la figura 27 las actividades de las principales MMPs estaban disminuidas en la deficiencia. Sin embargo, dado que los TIMPs son moduladores fisiológicos de la actividad de las MMPs, una caracterización completa de la capacidad degradativa de la MEC existente en un órgano requiere valorar las cantidades de estos inhibidores. Con este fin, se cuantificaron los inhibidores tisulares TIMP1 y TIMP2, mediante inmunoblot, en los mismos homogenados en los que se habían ensayado las actividades MMPs de animales control, VAD y RR.

Los resultados obtenidos (Figura 28), no mostraron diferencias en las cantidades de ninguno de los dos TIMPs entre los tres grupos de estudio. El hecho de que los inhibidores no variaran entre grupos experimentales, y las actividades proteolíticas de las MMPs si lo hicieran, es probable que sea consecuencia de una disminución en la cantidad de las mismas.



**Figura 28.** Cuantificación por Western blotting de TIMP1 y TIMP2. Los histogramas muestran, en unidades arbitrarias, la media  $\pm$  SD de los resultados obtenidos al densitometrar las bandas detectadas como TIMP1 (28 kDa) y TIMP2 (21 kDa), de las que se muestra un ejemplo representativo. El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

## 8. Determinación de citoquinas inflamatorias y profibróticas en la deficiencia de vitamina A

Ya hemos comentado la relación entre la deficiencia de vitamina A y la respuesta inflamatoria aguda, se ha descrito la deficiencia como un factor que la estimula provocando la activación de macrófagos y la producción descontrolada de citoquinas proinflamatorias, que producen cambios metabólicos como consecuencia del proceso inflamatorio (Harbige, 1996; Moldawer y Copeland, 1997). En este sentido, decidimos estudiar como se encontraban los niveles de algunos marcadores de inflamación aguda, profibróticos e infiltración neutrofílica, y así conocer el estado de los animales de estudio y poder esclarecer los mecanismos que desencadenan las alteraciones descritas hasta el momento en la MB y la MEC.

## 8.1. Citoquinas inflamatorias y profibróticas

### 8.1.1. Valoración de las interleuquinas 1 $\alpha$ y 1 $\beta$ , y el factor de necrosis tumoral

La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  pertenecen a una familia de proteínas con funciones muy importantes en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune. Son citoquinas proinflamatorias sintetizadas como moléculas precursoras (pro-IL-1 $\alpha$  y pro-IL-1 $\beta$ ) por una gran variedad de tipos celulares (macrófagos, monocitos, células T, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales y neutrófilos entre otros). La familia IL-1 está involucrada en la patogénesis de numerosas enfermedades con componentes inflamatorios, debido a sus actividades biológicas, principalmente pirogénesis, reabsorción ósea, presentación de antígenos a células T, proliferación de linfocitos B y T, síntesis de proteínas de fase aguda por hepatocitos, quimiotaxis de polimorfonucleocitos, y su liberación de la sangre y de la medula ósea.

El factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), también conocido como caquectina, es una citoquina sintetizada por monocitos y macrófagos que modula la respuesta inmune y actúa como potente pirógeno. El TNF $\alpha$  responde ante diferentes estímulos (agentes infecciosos o lesiones tisulares) con una gran variedad de efectos pro-inflamatorios, como activar los neutrófilos y las células del endotelio vascular, regular la actividad metabólica de diferentes tejidos, así como presentar actividad citotóxica y necrotizante frente a células tumorales, e inhibir la actividad lipoproteína lipasa.

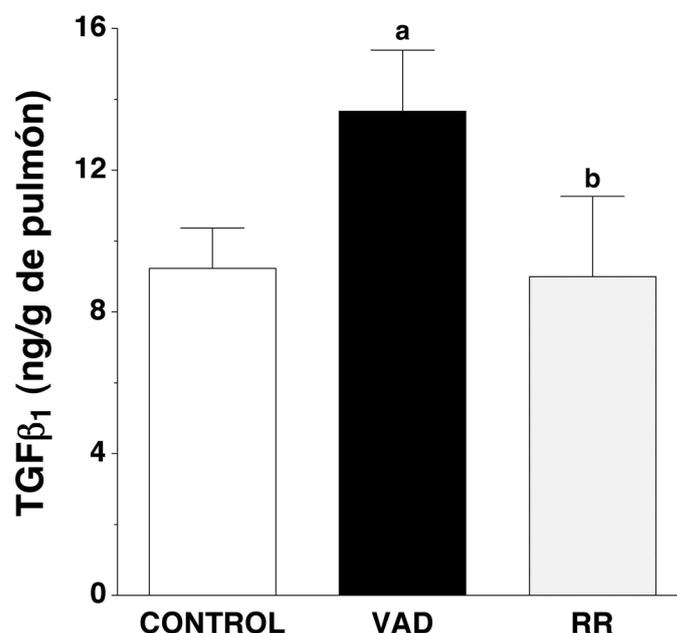
	CONTROL	VAD	RR
<b>PLASMA (ng/ml)</b>			
IL-1 $\beta$	2.05 $\pm$ 0.56	1.83 $\pm$ 0.29	2.12 $\pm$ 0.62
<b>PULMÓN (ng/g de tejido)</b>			
IL-1 $\alpha$	11.23 $\pm$ 1.86	9.23 $\pm$ 0.43	10.68 $\pm$ 0.23
IL-1 $\beta$	8.37 $\pm$ 0.79	8.83 $\pm$ 0.96	9.57 $\pm$ 2.12
TNF $\alpha$	0.97 $\pm$ 0.26	1.04 $\pm$ 0.24	0.78 $\pm$ 0.13

**Tabla 12.** Cuantificación de citoquinas inflamatorias en plasma y pulmón mediante ELISA. Se muestran los valores de la IL-1 $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y el TNF $\alpha$  de animales control, VAD y RR como media  $\pm$  SD en ng por g de pulmón y ng/ml de plasma. El número de animales por grupo fue de 5 controles, 5 VAD y 4 RR. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

La valoración de estas tres citoquinas se realizó mediante ELISAs comerciales específicos para rata, y los resultados que se muestran en la tabla 12 indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en las cantidades séricas y tisulares de ninguna de ellas.

### 8.1.2. Valoración del factor transformador de crecimiento $\beta_1$

El TGF- $\beta_1$  es una citoquina profibrótica producida por una gran variedad de células y tejidos. Modula diversas funciones celulares, incluyendo la proliferación y quimiotaxis de fibroblastos, estimulando las síntesis y deposición de tejido conectivo e inhibiendo la degradación del mismo, además tiene un papel potencial en el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, la secreción hormonal y la función inmunológica. Se ha descrito que niveles crónicamente altos de TGF- $\beta_1$  resultan en una excesiva fibrosis, caracterizada por un incremento de las deposiciones de colágeno (Cutroneo *et al.*, 2007).



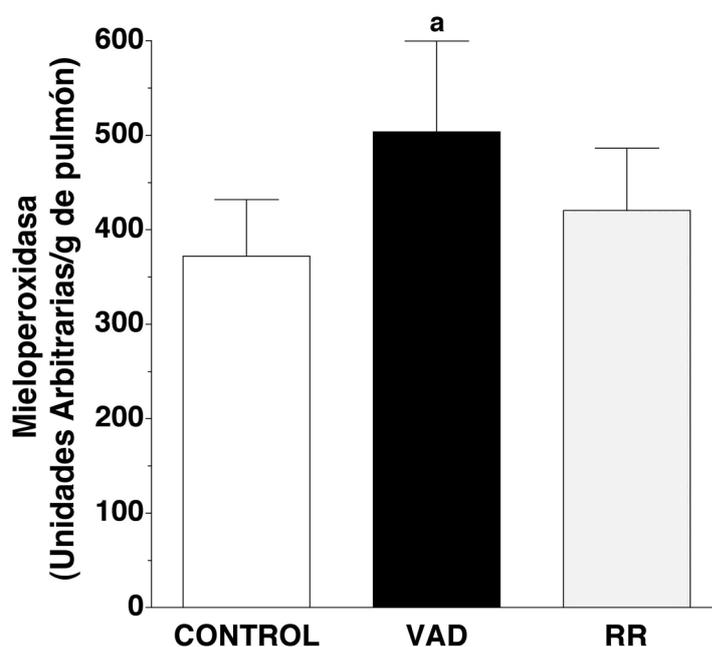
**Figura 29.** Determinación por ELISA del factor transformador de crecimiento  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) en pulmón. Los histogramas muestran la media  $\pm$  SD, en ng por g de pulmón. El número de animales por grupo fue de 5 controles, 5 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

Al igual que con el resto de citoquinas valoradas, el TGF- $\beta_1$  se midió mediante ELISA, obteniendo un incremento del 50% de la forma activa de este factor fibrogenético en las ratas VAD con respecto a los controles y una recuperación completa de sus niveles al tratar las ratas deficientes con ácido retinoico (Figura 29).

## 8.2. Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima ampliamente distribuida en el organismo, cuyos principales productores son los leucocitos (neutrófilos y monocitos). Se ha encontrado en diferentes fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial y semen entre otros) y también en diferentes tejidos (corazón, riñón, pulmón, hígado y placenta). En los neutrófilos es la proteína más abundante, representa un 5% de sus proteínas, y se encuentra localizada a nivel lisosomal en los gránulos azurófilos. Un incremento de la actividad MPO en un tejido es característico de neutrofilia, proceso común en un gran número de enfermedades inflamatorias pulmonares, como enfermedad obstructiva crónica, asbestosis, fibrosis pulmonar idiopática o distrés pulmonar. En estos casos aparece un aumento significativo de la actividad de MPO en proporción directa al número de neutrófilos infiltrados en el tejido, por lo que se puede utilizar su actividad como índice de migración leucocitaria y como marcador de inflamación (Haegens *et al.*, 2008).

Para evaluar el grado de infiltración leucocitaria en los pulmones de ratas alimentadas con dieta VAD, se determinó la MPO siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5 de Métodos. Nuestros resultados mostraron un incremento de un 35% en la actividad MPO de los animales VAD con respecto a los controles, con diferencias estadísticamente significativas, indicando una infiltración de leucocitos leve. El tratamiento de los animales deficientes con ácido retinoico revirtió la actividad MPO prácticamente a los valores control, únicamente un 10% superior a éstos, sin que fueran significativas las diferencias (Figura 30).



**Figura 30.** Determinación de la mieloperoxidasa en pulmón. Los histogramas muestran la media  $\pm$  SD, en unidades arbitrarias por g de pulmón. El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a ( $p < 0.05$ ).

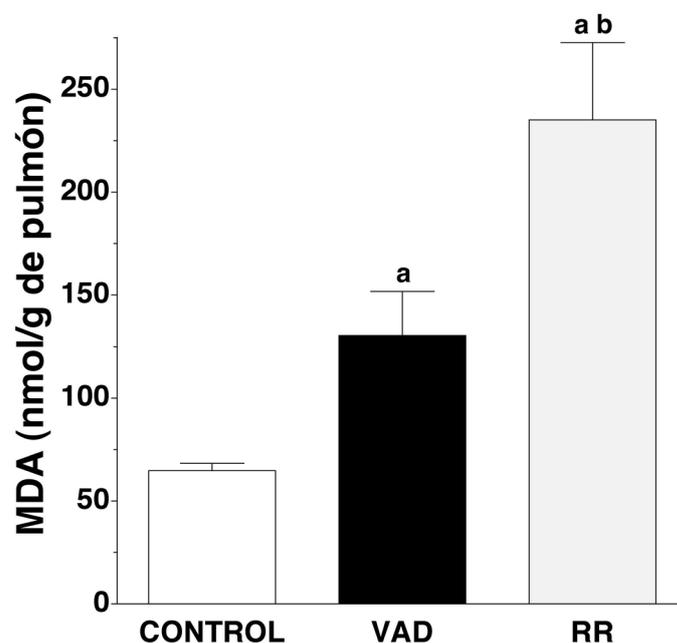
## 9. Valoración del estrés oxidativo pulmonar en la deficiencia de vitamina A

Como ya se ha mencionado en la Introducción, la vitamina A y sus derivados poseen propiedades antioxidantes y prooxidantes dependiendo de dos variables, la presión parcial de  $O_2$  y la concentración de retinoides. Un aumento de cualquiera de ellos favorece las reacciones de prooxidación, pero debido a su naturaleza lipofílica y su localización en el compartimento hidrofóbico de las membranas biológicas y lipoproteínas hacen que los retinoides sean compuestos efectivos en la reducción de la peroxidación lipídica, actuando como inhibidores de las reacciones de oxidación en cadena a concentraciones adecuadas (Das, 1989; Livrea y Tesoriere, 1998; Palace *et al.*, 1999; Conte da Frota *et al.*, 2006).

Debido a la posible acción antioxidante y prooxidante de los retinoides, entre ellos el ácido retinoico, del cual las dosis administradas a las ratas deficientes en vitamina A

fueron elevadas y que los pulmones están sometidos a presiones parciales de  $O_2$  elevadas, decidimos medir la peroxidación lipídica como marcador de estrés oxidativo. De esta forma pudimos comprobar el grado de estrés oxidativo, que la depleción de vitamina A y la posterior suplementación con ácido retinoico indujo sobre los pulmones de las ratas y, lo que es más importante, obtener información adicional que contribuya a aclarar los posibles mecanismos que desencadenan las alteraciones anteriormente descritas.

Llevamos a cabo la determinación de la peroxidación lipídica presente en los pulmones de ratas controles, VAD y RR, mediante la cuantificación por HPLC de los niveles de malondialdehído (MDA). En la Figura 31 se presentan los resultados obtenidos y se puede observar que en la deficiencia de vitamina A se produjo un aumento importante de los niveles de MDA, el doble que el de los animales control, y este incremento fue todavía mayor en los animales tratados con ácido retinoico, llegando a cuadruplicar el valor de los animales control. Las diferencias registradas fueron estadísticamente significativas.



**Figura 31.** Determinación de malondialdehído (MDA) en pulmón. Los histogramas muestran la media  $\pm$  SD, en nmoles por g de pulmón. El número de animales por grupo fue de 6 controles, 7 VAD y 4 RR. Los resultados significativamente diferentes respecto a los controles están indicados con a, y respecto al grupo VAD con b ( $p < 0.05$ ).

## **DISCUSIÓN**

## 1. Discusión

El propósito de nuestro trabajo ha sido analizar los efectos de la deficiencia crónica de vitamina A en la estructura y composición de la MB pulmonar durante el desarrollo postnatal de los pulmones, y el del tratamiento posterior con ácido *all-trans*-retinoico sobre las alteraciones encontradas. El análisis concreto de la MB alveolar, cuya integridad es de gran importancia para el intercambio de gases durante la función respiratoria, mostró en la deficiencia un engrosamiento de la misma, deposiciones ectópicas de fibrillas de colágeno en su interior, un aumento del contenido total de los colágenos I y IV, y cambios en su composición en cadenas  $\alpha$ . Además, la deficiencia de vitamina A produjo una disminución en el contenido de las cadenas de laminina mayoritarias en las MBs pulmonares, y modificó la actividad proteolítica de la MMP2 y MMP9, encargadas de la degradación y renovación de las MBs, disminuyéndola. También observamos que la privación de vitamina A durante este periodo del desarrollo provocó un aumento del factor fibrogenético TGF- $\beta_1$ , un incremento del estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria leve en los pulmones. Por otro lado, también demostramos que la mayoría de estas alteraciones, al menos parcialmente, revirtieron al estado control tras tratar con ácido *all-trans*-retinoico.

La vitamina A es un nutriente esencial para el organismo con diversas e importantes funciones fisiológicas, que al no poder ser sintetizada de novo hay que obtenerla a través de la dieta. La vitamina A ingerida en la dieta, principalmente en forma de ésteres de retinol y  $\beta$ -carotenos, actúa como pro-hormona que se metaboliza produciendo dos compuestos activos, el retinal y el ácido retinoico. Mientras que el retinal actúa como cromóforo en la visión, el ácido retinoico funciona como hormona pleiotrópica y ligando de las familias de receptores nucleares de retinoides RAR y RXR, regulando la expresión de un gran número de genes relacionados con diversos procesos fisiológicos. Además de la acción mediada por receptores, también se han propuesto otros mecanismos de acción para el ácido retinoico, como la unión directa a moléculas de señalización transduccional citoplasmáticas y la unión covalente a otras proteínas desconocidas (Myhre *et al.*, 1996; Radomska-Pandya *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2001).

Los retinoides y en especial el ácido retinoico, tienen un papel fundamental en el desarrollo embrionario, durante la fase de migración espacial, cuando se diferencian

los distintos tipos celulares que constituyen el organismo, y en el desarrollo postnatal cuando las células y tejidos crecen y maduran, adquiriendo diferentes funciones y grados de complejidad. El ácido retinoico regula la diferenciación celular a través de sus receptores nucleares y está involucrado en la formación de uniones gap y, por tanto, en la integración de las estructuras celulares (Biesalski y Nohr, 2003; Kawakami *et al.*, 2005).

En el caso concreto de los pulmones, la diferenciación, desarrollo y salud pulmonar y alveolar se ven afectados sustancialmente por los retinoides. En ratas, los alveolos pulmonares se forman durante el periodo temprano de vida postnatal y continúan desarrollándose aproximadamente hasta la semana 6-7 de vida (Massaro y Massaro, 2002). Alrededor del nacimiento y después de él, las actividades, niveles y expresión de los receptores citosólicos y nucleares para la vitamina A sufren importantes cambios. Además, también se producen variaciones en el contenido de los depósitos de vitamina A pulmonares, con una disminución de las formas de almacenaje y un incremento de las formas activas, como el retinol y el ácido retinoico (Zachman, 1995; Maden y Hind, 2004).

Entre otros efectos, se sabe que el tratamiento postnatal con ácido retinoico aumenta el número de alveolos pulmonares, atenúa la inhibición inducida por glucocorticoides en la alveolarización, aumenta el contenido de colágeno I en los tabiques de los espacios aéreos y otras proteínas de matriz, y mejora la supervivencia de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia (Massaro y Massaro, 1996; Veness-Meehan *et al.*, 2000). Además, el ácido retinoico regula algunos factores de crecimiento y genes relacionados con el desarrollo pulmonar, como los genes homeobox (Zachman, 1995).

La deficiencia de vitamina A es una de las deficiencias nutricionales más comunes en los países en vías de desarrollo, y es un problema grave de salud asociado a la mortalidad y morbilidad fetal e infantil (Downie *et al.*, 2005). Se han descrito numerosas alteraciones histopatológicas a nivel pulmonar en animales de experimentación deficientes en esta vitamina, alteraciones encontradas también en niños prematuros con reservas inadecuadas de vitamina A. Entre otros efectos, la deficiencia de vitamina A afecta a la correcta reparación del epitelio pulmonar, disminuye la densidad de alveolos y conductos alveolares y contribuye al desarrollo de displasias broncopulmonares (McGowan *et al.*, 2005; Baybutt y Molteni, 2007). Alrededor del 50% de las ratas neonatos deficientes en

vitamina A nacen muertas o mueren a los pocos días y, seguramente, sea como consecuencia de los cambios fisiopatológicos tan severos sufridos en los pulmones (Antipatis *et al.*, 1998).

Al mismo tiempo, en lo que respecta al efecto de los retinoides sobre la MEC, el ácido retinoico modula a través de receptores específicos la expresión de varias proteínas de la MEC, de forma directa actuando sobre sus promotores o indirecta modificando la expresión de otros factores profibróticos, como ya se ha comentado. Por ejemplo, se ha encontrado en cultivo que el ácido retinoico inhibe la síntesis de colágeno I en lipocitos hepáticos de rata así como la de los colágenos I y III en fibroblastos de pulmón humano (Krupsky *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995). *In vivo*, se ha visto que los riñones de ratas VAD tienen aumentado el contenido de los colágenos I y IV, y disminuidas las actividades MMPs (Marín *et al.*, 2005). En los pulmones, también de ratas VAD, hay menos colágeno en la adventitia de arterias pequeñas y arteriolas, y en los septos alveolares, pero está aumentado especialmente en áreas de neumonitis intersticial y permanece inalterado en la MEC peribronquial (Baybutt *et al.*, 2000; McGowan, 2007).

No son pocos los estudios que han investigado el efecto de los retinoides, y su deficiencia, sobre la fisiopatología pulmonar y la modulación que estos ejercen en la producción de proteínas de la MEC. A pesar de todo, no hay muchos trabajos que relacionen los efectos fisiopatológicos de la carencia de vitamina A, en los pulmones, con las alteraciones que esta deficiencia tiene sobre la biología y bioquímica de la MEC, y no solo eso sino que algunos se contradicen. En este contexto, aún hay menos trabajos que tengan como objeto de estudio la MB pulmonar en la deficiencia de vitamina A. Por lo expuesto anteriormente, pensamos que era de gran interés estudiar cómo afecta la deficiencia de vitamina A a la estructura y composición de la MB pulmonar, especialmente a la MB alveolar de animales en fase de desarrollo y crecimiento, y la reversibilidad de las alteraciones al tratar los animales deficientes con ácido retinoico.

Para estudiar los efectos que provoca la deficiencia crónica de vitamina A en la MB pulmonar se utilizó un modelo experimental compuesto por cuatro grupos de animales (ratas macho de la raza Wistar): animales control; animales con una deficiencia crónica de vitamina A (animales VAD); animales VAD recuperados con ácido retinoico (animales RR); y un último grupo de animales VAD tratados con el mismo vehículo en el que iba disuelto el ácido retinoico del grupo RR.

Como ya hemos comentado, la restricción severa de vitamina A durante el periodo de gestación altera el desarrollo fetal en humanos y resto de animales, aumentando el número de abortos y de malformaciones fetales (Gardner y Ross, 1993; Antipatis *et al.*, 1998). En este trabajo, se mantuvieron los niveles de esta vitamina dentro de los valores recomendados en las madres gestantes hasta el momento del nacimiento de las crías.

Para producir la depleción de vitamina A en las crías se inició la alimentación de las madres con dieta deficiente en vitamina A desde el comienzo del amamantamiento, ya que la deficiencia de vitamina A se produce tanto mas lentamente cuanto mayores son las crías, pues el calostro y la leche son fuentes ricas en vitamina A (Pasatiempo *et al.*, 1991; Gardner y Ross 1993) y compensan las bajas reservas de que se dispone en el momento del nacimiento. De este modo conseguimos que en un periodo de 60 días, sin disminución de la ingesta ni inhibición de la ganancia de peso corporal de forma significativa, los animales mostrasen una depleción casi absoluta de vitamina A plasmática y tisular.

El tratamiento con ácido retinoico comenzó a los 60 días de edad y se realizó durante 10 días consecutivos en los que los animales continuaron alimentándose con dieta VAD. El ácido retinoico se disolvió en aceite de girasol para poder ser inyectado intraperitonealmente, ya que es una sustancia liposoluble. Este aceite se caracteriza por carecer de *all-trans*-retinol y poseer una concentración de provitamina A en forma de carotenoides (luteína y zeaxantina, exclusivamente) de 0.102 µg/ml, lo que lo hace un vehículo adecuado para este tipo de estudios (Lietz *et al.*, 2001). La cantidad de ácido retinoico administrada (0.4 mg/kg de peso corporal, diariamente durante diez días), es similar a las utilizadas por otros autores (0.5 mg/kg de peso corporal, diariamente durante doce días) para revertir los efectos anatómicos encontrados en los pulmones de ratas con enfisema inducido por elastasa, o promover la septación en un modelo de ratas en el que la misma estaba alterada farmacológicamente o inhibida por O<sub>2</sub> (Massaro y Massaro, 1997; Massaro y Massaro, 2000; Veness-Meehan *et al.*, 2002).

El estado general de deficiencia de vitamina A alcanzado por las ratas de experimentación se estableció a través de los niveles plasmáticos de *all-trans*-retinol. La concentración plasmática de *all-trans*-retinol en el grupo de ratas VAD se encontraba en un valor medio de 0.07 µM, aproximadamente veinticinco veces menor que los niveles

encontrados en los animales control, alimentados con dieta completa, y el valor obtenido en el grupo RR fue aún menor ( $0.05 \mu\text{M}$ ). Estos valores son semejantes a los encontrados en otros estudios con modelos de deficiencia similares al nuestro, y diez veces más bajos de lo que establece la OMS como indicativo de deficiencia de vitamina A (Sommer, 1995; Rosales y Ross, 1998; Estornell *et al.*, 2000; Underwood, 2004; Marín *et al.*, 2005).

Además del estado general de los animales, se hacía necesario conocer el grado de deficiencia de vitamina A local en el órgano de estudio, y así poder atribuir los efectos observados a la deficiencia de esta vitamina. Se midieron los niveles de *all-trans*-retinol y de palmitato de *all-trans*-retinol en los pulmones de todos los grupos de animales, obteniendo valores similares a los descritos anteriormente en otros trabajos para el grupo control, y 50 veces más bajos en los animales VAD y RR (Wang *et al.*, 1999; Borrás *et al.*, 2003).

La deficiencia de vitamina A ocasionada a las ratas durante su desarrollo y crecimiento produjo importantes alteraciones en la MB pulmonar. La MBA se presentó con un importante aumento del grosor, aunque este engrosamiento no fue uniforme a lo largo de toda su extensión, existiendo tramos en los que la estructura apenas si se mostraba alterada y tramos en los que el engrosamiento fue marcadamente superior a la media, en contra de lo que suele ser una MBA sana cuya estructura es muy regular y uniforme. El tratamiento con ácido retinoico de los animales deficientes restableció parcialmente el grosor de la MBA a un valor intermedio entre los animales VAD y los control, y mejoró la uniformidad de la misma. Esta recuperación indica una acción directa del ácido retinoico sobre la ultraestructura de la MBA, derivada del efecto de este ácido sobre la expresión de las moléculas que la componen, como hemos demostrado en nuestros resultados.

El engrosamiento de la MB es un signo temprano asociado a muchas enfermedades, que suele aparecer incluso antes que las propias manifestaciones clínicas de dichas enfermedades. Se han descrito incrementos de hasta un 87% en el grosor de la MB del glomérulo renal (MBG) en ratones diabéticos, e incrementos más moderados pero igualmente significativos en la MBA de estos mismos ratones (Carlson *et al.*, 2003). A largo plazo en humanos diabéticos, se ha encontrado aumentado el tamaño de la MBG y de la MBA en un 67% y un 42% respectivamente (Weynand *et al.*, 1999). Se ha descrito

también, por diferentes autores, que la MB bronquial sufre un engrosamiento de la misma magnitud en varias enfermedades pulmonares, como el asma bronquial o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Watanabe *et al.*, 1997; Shahana *et al.*, 2005; Kranenburg *et al.*, 2006).

En nuestro modelo de deficiencia hemos documentado incrementos mayores en el grosor de la MBA, que los anteriormente mencionados, con tamaños que doblan el de los controles. Las regiones más finas del tabique interalveolar son las responsables del intercambio gaseoso y están constituidas por una delgada extensión protoplásmica de una célula epitelial, o neumocito tipo I, el fino cuerpo de una célula endotelial capilar y una MB entre las dos capas de células (Maina y West, 2005). En mamíferos la MEC constituye el 41% del volumen total de la barrera aire-sangre (Meban, 1980) y la MB representa incluso más en las regiones finas, de forma que una MB con un grosor el doble de lo normal seguramente dificulte el intercambio de gases y perjudique la función pulmonar, ya que el oxígeno y el anhídrido carbónico atraviesan esta barrera aire-sangre por difusión pasiva durante la respiración, y sus propiedades estructurales influirán en la tasa y eficiencia de la transferencia de gases.

De acuerdo con esto, se ha descrito una disminución de la capacidad intercambiadora de gases por parte de los alveolos y de la permeabilidad alveolocapilar en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Guazzi *et al.*, 2002; Guvener *et al.*, 2003; Ozşahin *et al.*, 2006). Por el contrario, otros autores no han encontrado detrimento alguno en el intercambio gaseoso en diabéticos insulino-dependientes, sospechosos de tener la MBA engrosada, en base a un trabajo anterior realizado en autopsias de diabéticos tipo I. Sin embargo, es posible que los pacientes examinados no tuvieran muy engrosada la MBA (Minette *et al.*, 1999). A pesar de todo, no hay ningún estudio que aporte información sobre la capacidad intercambiadora de gases en ratas VAD, aunque sí se ha comprobado que la permeabilidad alveolo-capilar, medida mediante el aclaramiento del ácido  $^{99m}\text{Tc}$ -dietilentriaminopentaacético, está reducida al 50% del valor de los controles (McGowan *et al.*, 2002).

La MBA de los animales VAD no solo aparecía engrosada sino que además contenía abundantes fibrillas de colágeno con apariencia desordenada, que desaparecían prácticamente por completo al tratar con ácido retinoico. El estudio inmunocitoquímico

que realizamos de las muestras, indicaba que dichas fibrillas estaban compuestas por colágeno I, pero no se puede descartar que otros colágenos fibrilares, como el colágeno III y V, también formen parte de su composición ya que se han encontrado con anterioridad fibras de colágeno heterotípicas formadas por fibrillas de distintos tipos de colágeno (I, III y/o V) (Kreis y Vale, 1993; Gelse *et al.*, 2003). No obstante, las fibras de colágeno intersticial, mayoritariamente formado por colágeno I, y de colágeno reticular, formado por los colágenos III y V, se diferencian ultraestructuralmente por el grosor de las fibrillas de colágeno que las constituyen (Fleischmajer *et al.*, 1980; Montes *et al.*, 1980; Roche *et al.*, 1989; Montes, 1996; Ushiki, 2002). De este modo, la similitud en el grosor de las fibrillas que encontramos en el interior de la MB y las fibrillas de colágeno intersticial sugiere que están compuestas principalmente o exclusivamente por colágeno I.

Este tipo de alteraciones, en las que la MBA está engrosada y aparecen fibrillas de colágeno en el interior de la MB y del septo interalveolar, se han observado en los dos tipos más comunes de fibrosis pulmonar idiopática (Magro *et al.*, 2006) y en pacientes con el síndrome de la bronquiolitis obliterans (BOS), que resulta del rechazo crónico del trasplante de pulmón desarrollado por algunos pacientes (Magro *et al.*, 2005). En otro órgano como el riñón, también se han descrito estas alteraciones en algunas enfermedades, como la glomerulonefritis fibrilar (Ivanyi y Degrell, 2004) o la nefropatía crónica posttrasplante (Ivanyi *et al.*, 2000). Magro *et al.* muestran datos respaldando la posibilidad de que sea una lesión de origen inmune, de las células endoteliales microvasculares, la que esté implicada en el desarrollo de las alteraciones de la MB pulmonar y en las abundantes deposiciones de colágeno en el parénquima pulmonar terminal, que son características de estas patologías.

No se puede deducir de nuestro estudio que sea este, una lesión del endotelio microvascular de origen inmune, el caso en la deficiencia de vitamina A. Aunque, el aumento detectado de actividad mieloperoxidasa, indicativo de una infiltración de células inflamatorias en los pulmones de ratas VAD, podría encajar con esta posibilidad. El daño oxidativo ocasionado por la deficiencia sobre las células endoteliales puede inducir la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión en el endotelio microvascular que reclutarían células inflamatorias desencadenando los procesos fibróticos. De hecho, hemos demostrado que los pulmones de los animales VAD se encuentran sometidos a estrés oxidativo, como manifiesta el aumento del contenido de malondialdehído, y está

documentado que la exposición de células endoteliales a especies reactivas de oxígeno aumenta la cantidad de moléculas de adhesión celular en su superficie y la expresión de citoquinas quimiotácticas e inflamatorias, como la interleuquina 8 (Jacobi *et al.*, 2005; Jacobi *et al.*, 2006).

La infiltración de células inflamatorias junto con la presencia de áreas de neumonitis intersticial, con aumento del colágeno, ya ha sido observado en los pulmones de ratas VAD (Baybutt *et al.*, 2000). De todas maneras, y a pesar de la infiltración leucocitaria, la ausencia de incrementos en la cantidad de interleuquinas proinflamatorias, como son las interleuquinas  $1\alpha$ ,  $1\beta$  y el  $TNF\alpha$ , en el plasma y en los pulmones de nuestras ratas deficientes indica que el proceso inflamatorio ha de ser leve y local.

El colágeno IV, principal componente proteico de las MBs, ha sido uno de los objetivos prioritarios de nuestro estudio, tanto la valoración de su contenido total en los pulmones como su composición en cadenas. En cuanto al contenido total, encontramos un incremento significativo, prácticamente del doble, en los pulmones de animales deficientes con respecto a los controles. La proporcionalidad entre los incrementos del grosor de la MBA y el contenido total de colágeno IV indica que no hay cambios en la densidad de colágeno IV en la MB pulmonar VAD, y que es este aumento del colágeno IV el principal responsable del aumento del grosor de la MB pulmonar. Además, el tratamiento con ácido retinoico recuperó el contenido pulmonar en colágeno IV a los valores control, contribuyendo a la reversión del engrosamiento sufrido por la MBA.

En un estudio previo, realizado en nuestro laboratorio, se mostraba cómo la deficiencia de vitamina A alteraba profundamente las MBs renales, modificando su grosor con incrementos de 2 y 6 veces en la MB glomerular y tubular respectivamente. También se identificaron abundantes fibrillas de colágeno I en la MB tubular, y un incremento de 2 veces en el contenido de colágeno tipo IV (Marín *et al.*, 2005). Las similitudes que se encuentran entre las alteraciones observadas en las MBs renales y pulmonares nos sugieren un mecanismo común para los efectos de la deficiencia de vitamina A sobre las MBs de diferentes tejidos.

El hecho de que el contenido pulmonar en colágeno IV se recupere completamente al administrar ácido retinoico y que el grosor de la MBA no lo haga, puede deberse

a que la valoración de colágeno IV se realizó en un extracto de pulmón en el que se cuantificaron todas las MBs pulmonares, mientras que las medidas de grosor de la MB se realizaron únicamente en la zonas finas del tabique alveolar, donde las MBs epitelial y endotelial están fusionadas y perfectamente delimitadas, permitiendo obtener medidas más precisas, y por tanto puede ser que el grosor de la MBA no termine de recuperarse mientras que el grosor del resto de MBs pulmonares sí que lo hagan. Además, sabemos por nuestros resultados que otras proteínas de la MB, como algunas cadenas de laminina, no se recuperan.

Dada la influencia que la MB tiene sobre las células circundantes y el intercambio de información que existe entre ellas, no es de extrañar que las alteraciones de la MB puedan desencadenar modificaciones en la función, los procesos de reparación y el estado de activación de las células que la rodean, contribuyendo o predisponiendo hacia el desarrollo de lesiones en el órgano afectado (Van Vliet *et al.*, 1999). En este sentido, hay diversos tipos de receptores celulares que se activan al unirse a ellos colágeno, concretamente estructuras tridimensionales de las moléculas de colágeno, y que son capaces de modular el comportamiento celular (adhesión, diferenciación o crecimiento), como las integrinas, los receptores con dominio discoidina, la glicoproteína VI o receptores especializados de proteoglicano (Gelse *et al.*, 2003). Este hecho hacía conveniente el estudio de la composición del colágeno I y IV, ya que modificaciones en las proporciones de cadenas  $\alpha$  de estos colágenos podría resultar en la formación de moléculas con estructuras tridimensionales distintas a los normales y modificación de las actividades de estos receptores, y en consecuencia del comportamiento celular, tisular y orgánico.

El incremento encontrado en el contenido de colágeno IV no afecta por igual a todas las cadenas  $\alpha$  que lo constituyen. Algunas cadenas ven alterado su contenido de forma significativa por acción de esta deficiencia, sin embargo, no se induce un cambio uniforme en la expresión de todas cadenas, ni a nivel cuantitativo ni cualitativo. Existen diferencias cuantitativas, ya que las variaciones para algunas cadenas son mayores que para otras con respecto a los controles, y además existen diferencias cualitativas, ya que sorprendentemente unas cadenas aumentan su contenido, mientras que otras no varían respecto a las muestras procedentes de animales control. Así,  $\alpha 1(\text{IV})$ ,  $\alpha 3(\text{IV})$  y  $\alpha 4(\text{IV})$  están aumentadas, mientras que  $\alpha 2(\text{IV})$  y  $\alpha 5(\text{IV})$  no varían de forma significativa.

Además, el tratamiento con ácido retinoico hizo revertir las alteraciones en el contenido de las cadenas  $\alpha$  a los niveles control.

Se han descrito en carcinomas de pulmón diferencias en el contenido de las distintas cadenas  $\alpha$  del colágeno IV que constituye las MBs. Este estudio en concreto, utiliza los mismos anticuerpos monoclonales que nosotros, para investigar mediante inmunohistoquímica la expresión de la distintas cadenas  $\alpha$  en pulmones normales y en adenocarcinomas de pulmón con un patrón broncoalveolar de crecimiento en la periferia. En él se observa que en los pulmones normales la MBA está compuesta por los protómeros  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  y  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$  distribuidos homogéneamente, y que en las áreas no colapsadas de los adenocarcinomas los protómeros  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$  pasan a distribuirse de forma discontinua, mientras que los trímeros  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  forman capas continuas, y por último que en las áreas colapsadas la MBA está compuesta únicamente por una capa gruesa de las trímeros  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$ , debido a la pérdida completa de las cadenas  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$ . No está claro el mecanismo que desencadena la remodelación del colágeno IV de la MBA en el adenocarcinoma, pero los autores sugieren que se produce una activación de la síntesis de las cadenas  $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$  que se acumulan y van desplazando hacia el estroma las cadenas  $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})/\alpha 5(\text{IV})$ , provocando su paulatina desaparición (Nakano *et al.*, 2001).

Otros autores han visto una redistribución de la cadena  $\alpha 1$  del colágeno IV y la Laminina 5, así como una pérdida progresiva de colágeno VII y de la cadena  $\alpha 3(\text{IV})$  en distintos cánceres pulmonares, alteraciones que se correlacionan con su progresión e invasividad. En este caso tampoco están claros los mecanismos que producen dichas alteraciones, pero sí se sabe que en los procesos tumorales la MEC y especialmente la MB sufre importantes modificaciones según el estadio, tanto por degradación mediada por metaloproteasas como por deposición de sus componentes al sobreexpresarse (Catusse *et al.*, 2000).

En el riñón, que comparte con el pulmón grandes similitudes en sus MBs, hay algunas patologías renales en las que también se han descrito modificaciones en el contenido de las distintas cadenas  $\alpha$  del colágeno IV. Por ejemplo, en modelos experimentales de glomeruloesclerosis, se han realizado estudios mediante microscopía de fluorescencia, encontrando que la intensidad de fluorescencia para la cadena  $\alpha 1(\text{IV})$  en la matriz

mesangial, así como para las cadenas  $\alpha 3(\text{IV})$  y  $\alpha 4(\text{IV})$  en la MBG se vio incrementada diez veces tras inducir, mediante inmunocomplejos, la enfermedad en los animales de experimentación. En cambio, no se detectó ninguna variación en la intensidad de la cadena  $\alpha 2(\text{IV})$  (Bergijk *et al.*, 1998).

No podemos decir que estas situaciones sean idénticas a las que hemos encontrado en la deficiencia de vitamina A, ni que respondan a los mismos mecanismos, pero son procesos patológicos que conllevan una remodelación de la MB como signo histopatológico claro, y creemos que ocurre algo similar en la deficiencia de vitamina A. En el estudio de Marín *et al.* del 2005 también se observaron variaciones en la proporción de cadenas  $\alpha$  del colágeno IV, en la MB renal de animales VAD. En su caso, las cadenas  $\alpha 1(\text{IV})$ ,  $\alpha 4(\text{IV})$ ,  $\alpha 5(\text{IV})$  y  $\alpha 6(\text{IV})$  veían aumentado su contenido, mientras que  $\alpha 2(\text{IV})$  y  $\alpha 3(\text{IV})$  disminuían de forma significativa. Sin embargo, una conclusión común con nuestro trabajo actual es que los cambios observados en el contenido de las cadenas  $\alpha$  del colágeno IV en la MB pulmonar de los animales VAD y RR, respecto a los animales control, se correlacionan perfectamente con los valores de mRNA detectados para cada una de las cadenas ( $r = 0.878$ ,  $p = 0.0008$ ). Y por tanto, existe una regulación de la expresión de las cadenas de colágeno IV por parte de la deficiencia de vitamina A y el ácido retinoico a nivel del mRNA, pudiendo afectar a la transcripción de los genes o a la estabilidad del propio mRNA o a ambas.

Resulta de especial interés que la cantidad de mRNA para la cadena  $\alpha 1(\text{IV})$  se encuentre aumentada mientras que la del mRNA para  $\alpha 2$  permanezca inalterada, dado que los genes para ambas cadenas comparten el mismo promotor y éstas se asocian en una proporción definida (2:1) para formar los protómeros. Algo parecido ocurre con el otro protómero  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$ , ya que  $\alpha 3(\text{IV})$  y  $\alpha 4(\text{IV})$  presentan valores de mRNA aumentados y  $\alpha 5(\text{IV})$  permanece inalterado. Consiguientemente, estos resultados indican que los trímeros formados por  $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$  y  $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})/\alpha 5(\text{IV})$  no se coexpresan de manera coordinada bajo condiciones de deficiencia en vitamina A. De hecho, la posibilidad de que los genes para  $\alpha 1(\text{IV})$  y  $\alpha 2(\text{IV})$  no se transcriban simultáneamente, a pesar de compartir el mismo promotor bidireccional, ya ha sido comentada, debido a las variaciones en el ratio de los transcritos  $\alpha 1(\text{IV})$  y  $\alpha 2(\text{IV})$  que presentan los diferentes tejidos (Bergijk *et al.*, 1998).

El desequilibrio en las cantidades de cada una de las cadenas que forman los trímeros  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  y  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$ , nos hace pensar que el proceso de ensamblaje de la molécula de colágeno IV está alterado, apareciendo protómeros que en condiciones normales no se forman. Una posibilidad es que el exceso de unas cadenas sobre otras propicie la formación de homotrímeros del tipo  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 1(\text{IV})$ , ya descritos para el colágeno I, o que la cadena  $\alpha 1(\text{IV})$  reemplace a la cadena  $\alpha 5(\text{IV})$  en el protómero  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$ , resultando  $\alpha 1.\alpha 3.\alpha 4(\text{IV})$ . Combinaciones similares entre las cadenas que aparecen en exceso, han sido sugeridas en ciertos estados patológicos de nefritis experimental, donde se encuentran aumentados los niveles de mRNA y proteínas para las cadenas  $\alpha 1(\text{IV})$  y  $\alpha 4(\text{IV})$ , de forma que también aparece un excedente de ambas con respecto a las otras dos cadenas,  $\alpha 2(\text{IV})$  y  $\alpha 3(\text{IV})$  que no aparecen aumentadas (Van Vliet *et al.*, 1999). Y más recientemente, se ha demostrado que el dominio NC1 de la cadena  $\alpha 1(\text{IV})$  es capaz de autoensamblarse para formar homotrímeros e incluso para formar homohexámeros. A pesar de todo, los autores sugieren que el ensamblaje del homotrímero de  $\alpha 1(\text{IV})$  es menos eficiente en condiciones normales que el del heterotrímero  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$ , que será la forma predominante (Khoshnoodi *et al.*, 2006b). Estos cambios, en la formación de los protómeros del colágeno IV, pueden afectar no solo a la estructura y función de la MB sino también a las funciones de las células vecinas. En este sentido se ha descrito la formación de homotrímeros de  $\alpha 1(\text{I})$  en ratones deficientes en  $\alpha 2(\text{I})$ , tanto en homocigosis como heterocigosis, con deposición anormal de colágeno y conduciendo a glomerulopatía, de forma dosis-génica dependiente (Brodeur *et al.*, 2007).

Una tercera posibilidad, es que las cadenas en exceso se secreten como monómeros, descrito ya para la cadena  $\alpha 1(\text{IV})$  (Kajimura *et al.*, 2004), pudiendo interferir estos monómeros libres en el proceso de ensamblaje de la MB y su función. En este sentido, se sabe que algunas de las funciones que desempeña la MB se activan mediante dominios encriptados en las cadenas  $\alpha(\text{IV})$ , que no están expuestos cuando la molécula de colágeno IV está bien plegada y estructurada, pero que se liberan o se muestran por proteólisis en los procesos de remodelación de la MB. Se han descrito dominios, como los dominios NC1 de las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  del colágeno IV (conocidos como arresteno, canstatina y tumstatina, respectivamente) con potentes propiedades antiangiogénicas, y proapoptóticas en células endoteliales. Así, estos monómeros secretados anómalamente podrían mostrar dominios con actividades específicas que no deberían estar expuestos (Maeshima *et al.*, 2000; Marneros y Olsen, 2001; Kalluri, 2002; He *et al.*, 2003).

Por otro lado, estudios anteriores muestran que el ácido retinoico modula directamente la expresión de distintos colágenos, aunque éste es un tema bastante controvertido, ya que hay grandes diferencias en los resultados que, a veces, son incluso opuestos. En el caso concreto del colágeno IV, hay un trabajo que describe una inhibición en la biosíntesis del mismo al tratar células renales con ácido retinoico, lo cual encajaría con nuestros resultados ya que el colágeno IV total y las cadenas que lo forman revierten sus alteraciones y recuperan los valores control al administrar este ácido (Taub, 1991). En cambio, la exposición crónica a ácido retinoico en células epiteliales de pulmón produce un incremento en la biosíntesis del colágeno IV (Federspiel *et al.*, 1991). Al parecer, los efectos que ejerce el ácido retinoico sobre la proliferación y producción de colágeno, incluso en un mismo tipo celular, están fuertemente influenciados por el tipo de MEC con el que las células contactan (Jutley *et al.*, 1993), y en nuestro caso ya hemos visto como la MEC de los animales VAD, a los que se les administró el ácido retinoico, estaba alterada.

Otro componente importante de las MBs, tanto por su contenido como por sus funciones, es la laminina. A diferencia de las subunidades del colágeno IV, todas las cadenas de laminina valoradas sufren importantes disminuciones en la deficiencia y, sorprendentemente, al tratar con ácido retinoico se recuperan las cadenas laminina  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ , pero no lo hacen las cadenas laminina  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  indicando un cambio en el patrón de lamininas, como ocurre durante el desarrollo de distintos órganos (Nguyen y Senior, 2006), o indicando una posible expresión no coordinada de las distintas cadenas que forman las lamininas. Al igual que ocurría con las cadenas  $\alpha$  del colágeno IV, si comparamos los niveles de mRNA de las lamininas con los valores de proteína vemos que hay una buena correlación en las cantidades detectadas entre los distintos grupos de estudio ( $r = 0,9307$ ,  $p = 0,007$ ), indicando que la deficiencia de vitamina A y el ácido retinoico regulan la expresión de estas proteínas principalmente a nivel del mRNA.

El hecho de que las cadenas de laminina estén disminuidas en la deficiencia de vitamina A nos indica que no contribuyen al aumento de grosor de la MBA por deposición, como ocurría con el colágeno IV y el colágeno I. Probablemente, su contribución al engrosamiento sea porque no están ejerciendo correctamente su función de andamiaje para el reclutamiento del resto de componentes de la MB, y al disminuir su contenido se favorece una mala estructuración durante la remodelación de la MB, que parece que

esté ocurriendo en la deficiencia de vitamina A. En este sentido, estudios con ratones mutantes muestran cómo las lamininas son esenciales para una correcta organización de las MBs (Miner y Li, 2000; Nguyen *et al.*, 2002a; Miner y Yurchenco, 2004).

Por ejemplo, en ratones deficientes para la cadena laminina  $\alpha 5$  se ha estudiado el desarrollo pulmonar prenatal, únicamente, ya que estos ratones morían antes de su nacimiento, no permitiendo estudiar el pulmón postnatal. En estos ratones se produce un defecto en la septación del pulmón derecho en los cuatro lóbulos naturales, que se atribuye al hecho de que esta cadena es la única cadena  $\alpha$  que está presente en la MB de la pleura visceral y que su ausencia produce un fallo en la formación y/o una mayor fragilidad de la misma, lo que produce un fallo en la septación durante el desarrollo temprano del pulmón (Nguyen *et al.*, 2002b). En el periodo postnatal se sabe, que la alveolarización está severamente alterada en ratones a los que se les inhibió específicamente la transcripción de la cadena laminina  $\alpha 5$ , en células epiteliales pulmonares (Miner y Yurchenco, 2004). Además, durante el desarrollo embrionario renal, cuando la MBG se remodela y la cadena laminina  $\alpha 1$  debe sustituirse por la laminina  $\alpha 5$ , los ratones knockout para la cadena laminina  $\alpha 5$  mostraron graves defectos en la glomerulogénesis y una MBG ensamblada defectuosamente (Miner y Li, 2000).

La laminina 111 se expresa de forma generalizada durante la embriogénesis y la delección de cualquiera de sus cadenas es letal peri-implantación. La supresión de la cadena laminina  $\beta 1$  o  $\gamma 1$  tiene como consecuencia el fallo en la formación de las moléculas de laminina y consecuentemente en la formación de las MBs visceral y parietal (MB de Reichert) de los blastocitos (Yurchenco y Wadsworth, 2004). Un estudio en el que tratan con anticuerpos anti-laminina 111 explantes de pulmón embrionario, muestra la importancia de estas cadenas en el desarrollo pulmonar, ya que se produce una reducción en el crecimiento del explante, una disminución marcada en la morfogénesis de ramificaciones pulmonares y anomalías en el árbol bronquial (Schuger *et al.*, 1990). Otros autores han comprobado la importancia de la cadena de laminina  $\gamma 1$  en la estructura de la MBA, observando, en mutantes a los que les falta el lugar de unión a nidogeno de esta cadena, severos defectos en la interfase aire-sangre asociados a defectos en la MBA (Willem *et al.*, 2002).

Además, estudios con ratones knockout para otras cadenas de laminina, como la cadena laminina  $\beta 2$ , han mostrado que es un componente necesario para el correcto funcionamiento de la MBG como barrera de filtración glomerular. Estos ratones presentan una MBG organizada anormalmente con deposiciones ectópicas de otras lamininas, intentando compensar su ausencia, y cambios en la porosidad y en el número de sitios aniónicos, lo que cambia las propiedades de gel típicas de la MBG (Jarad *et al.*, 2006).

En cuanto al efecto de los retinoides sobre la expresión de las cadenas de laminina se sabe desde hace tiempo que el ácido retinoico es capaz de inducirla. En trabajos con células F9 de carcinoma embrionario, se ha visto que el ácido retinoico produce su diferenciación. Células similares a las epiteliales se transforman en células endodermo parietales, y simultáneamente, hay un aumento de los niveles de mRNA de las cadenas laminina  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  (laminina 1), y de los receptores tipo integrina (Wang *et al.*, 1985; Kleinman *et al.*, 1987; Wang y Gudas, 1988). Un análisis exhaustivo del promotor del gen que codifica para la cadena laminina  $\beta 1$  permitió identificar como RARE una secuencia de 46 pares de bases en la región 5', al que se le unen los receptores RARs en presencia de ácido retinoico y activan la transcripción (Vasios *et al.*, 1989; Li y Gudas, 1996). Este hecho podría explicar por qué durante la deficiencia de vitamina A se reduce la cantidad de mRNA de esta cadena; al no haber ácido retinoico los RARs no se unen al DNA y no activan su transcripción, y al tratar con ácido retinoico se recupera el valor de los controles.

Por otro lado, se ha descrito que las lamininas juegan un papel importante en la reparación de heridas y lesiones tisulares y, además, como ya hemos comentado en la introducción, la deficiencia o ingesta baja de vitamina A altera los procesos de cicatrización y curación de heridas, así como la prevención de lesiones pulmonares (Hunt, 1986; Takahashi *et al.*, 1993; Chytil, 1996; Zhang y Kramer, 1996; Swartz-Basile *et al.*, 2003; Frank y Carter, 2004; Abdelmalek y Spencer, 2006; Baybutt y Molteni, 2007; Tzu y Marinkovich, 2008). Por ello, los cambios descritos en la expresión y cantidad de las distintas lamininas estudiadas en nuestro modelo de deficiencia en vitamina A podrían tener su importancia en el desarrollo de diferentes lesiones o alteraciones en la arquitectura pulmonar. En este sentido un trabajo con ratas a las que se les había reseccionado el intestino demuestra cómo la deficiencia de vitamina A modifica la MEC

del intestino remanente, produciéndose una reducción en la expresión de laminina en la MB y relacionándose este hecho con una inhibición en la adaptación intestinal a la resección, al reducirse la proliferación celular, aumentarse la apoptosis y reducirse marcadamente la migración de enterocitos (Swartz-Basile *et al.*, 2003).

Los cambios y alteraciones documentados en nuestro estudio, a nivel de la MB, como engrosamiento, aumento del colágeno IV y disminución de lamininas, o deposición ectópica de colágeno I en el interior de la misma, podrían tener graves consecuencias, a medio y/o largo plazo, sobre la función del órgano, y el desarrollo de posibles patologías que pueden derivarse de, o ser mediadas por, dichos cambios. Pues, como ya hemos discutido previamente, algunas de estas alteraciones son signos tempranos asociados a distintas enfermedades, que pueden aparecer incluso antes que las propias manifestaciones clínicas de dichas enfermedades.

El mecanismo por el cual la deficiencia en vitamina A origina cambios en la composición de la MB y en particular en la composición de las subunidades de colágeno IV y de laminina, no está dilucidado. Pero, los resultados obtenidos en este trabajo aportan información al respecto.

A pesar de la infiltración leucocitaria, indicada por el aumento de actividad mieloperoxidasa, no se encuentran aumentadas las citoquinas proinflamatorias ni en los pulmones ni en el plasma del grupo VAD. Estos datos son compatibles con un proceso inflamatorio local y moderado como ya hemos comentado antes, y descartan una inflamación aguda en el momento del sacrificio (Baybutt *et al.*, 2000; Reifen *et al.*, 2002). Por el contrario, en estos mismos pulmones sí que se apreció un incremento significativo de la forma activa del factor fibrogenético TGF- $\beta_1$ , que recuperó los valores control al tratar con ácido retinoico.

El TGF- $\beta_1$  es capaz de inducir la síntesis de los colágenos I, III y IV (Fine y Goldstein, 1987; Douthwaite *et al.*, 1999) y, dado que varía en paralelo con los cambios observados en la MBA, puede ser un mediador de los efectos de la deficiencia y del tratamiento con ácido retinoico en la MBA y la MEC pulmonar. Basándonos en la información que proporciona la literatura, la relación entre los retinoides y la familia de proteínas TGF- $\beta$  parece bastante compleja y los resultados publicados acerca

de los efectos del ácido retinoico sobre la expresión del TGF- $\beta_1$  son contradictorios. Aún así, en la línea de nuestros resultados, el tratamiento con ácido retinoico reduce significativamente el contenido glomerular de TGF- $\beta_1$  en un modelo experimental de glomerulonefritis, en el que está aumentada la expresión del TGF- $\beta_1$  (Morath *et al.*, 2001). Además, se ha propuesto que los receptores de ácido retinoico pueden funcionar como activadores de la ruta de señalización TGF- $\beta$ /Smad en ausencia de ácido retinoico o como inhibidores en su presencia (Pendaries *et al.*, 2003). La familia de proteínas Smad son mediadores citoplasmáticos que se fosforilan cuando el TGF- $\beta$  se une a sus receptores específicos con actividad serina/treonina kinasa, transduciendo las señales intracelularmente y regulando la transcripción de los genes diana.

Son muchos los tipos de células que son capaces de sintetizar TGF- $\beta_1$ , aunque teniendo en cuenta las similitudes en las variaciones observadas en la MPO y el TGF- $\beta_1$ , en los pulmones de ratas VAD y tratadas con ácido retinoico, es sugerente considerar las células inflamatorias como su fuente principal. Ya ha sido observado previamente un aumento en la expresión de mRNA del TGF- $\beta_1$  por parte de los macrófagos alveolares, asociado a zonas de fibrosis activa en el tejido pulmonar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Broekelmann *et al.*, 1991). En este contexto, es apropiado recordar la frecuente aparición de haces de fibrillas de colágeno adosadas a la membrana plasmática de las células endoteliales, observadas en el grupo VAD, lo que parece indicar un origen endotelial para estas fibrillas y, en consecuencia la implicación de las células endoteliales en un proceso fibrótico. Este proceso fibrótico podría estar relacionado u ocasionado por una transición epitelio-endotelio mesénquima (EMT), como ya se ha descrito en la fibrosis pulmonar idiopática o en fibrosis renal tubulointersticial (Willis *et al.*, 2005; Rhyu *et al.*, 2005).

La transición epitelio-endotelio mesénquima se define como la adquisición por parte de las células epiteliales o endoteliales del fenotipo y la función de los fibroblastos del mesénquima. Este proceso dinámico ocurre durante el desarrollo embrionario pero, además, juega un papel importante en la génesis de fibroblastos que se produce durante el desarrollo de fibrosis, de carcinogénesis o en el desarrollo de enfermedades crónicas en diferentes órganos (Kalluri y Neilson, 2003; Takkunen *et al.*, 2008).

En los procesos de EMT, el epitelio-endotelio en transición pierde la polaridad y los contactos célula-célula, lo que se refleja en una reorganización del citoesqueleto celular. Además, estos procesos se caracterizan por la deposición de colágenos, elastina, tenascina y otras proteínas propias de la MEC, produciendo así fibrosis en el órgano afectado (Kalluri y Neilson, 2003). Se inicia con la combinación de citoquinas y la digestión proteolítica de la MB sobre la que reside el epitelio y endotelio. La MB es desmontada mediante la acción de las MMPs o de inhibidores de su ensamblaje (Yang y Liu, 2001; Zeisberg *et al.*, 2002). Se sabe que uno de los principales inductores de la EMT es el TGF- $\beta_1$ , experimentos con células epiteliales alveolares expuestas a esta citoquina presentaron incrementada la expresión de marcadores de células mesenquimales, además de colágeno tipo I, vimentina y desmina, con una progresiva transformación hacia una morfología tipo fibroblasto (Willis *et al.*, 2005).

De forma alternativa o adicionalmente, la carencia de ácido retinoico puede alterar la expresión de las moléculas que componen la MEC mediante modulación transcripcional. Como ya hemos visto en la introducción, los retinoides pueden ejercer sus efectos fisiológicos uniéndose a los receptores nucleares de retinoides X (RXR) y de ácido retinoico (RAR). Ambos tipos de receptores se dividen en tres subtipos denominados alfa, beta y gamma. Los diferentes subtipos de RARs poseen diversos dominios estructurales, que incluyen un dominio de unión a ligando, los diferentes retinoides, y un dominio de unión a DNA, que se une a elementos específicos del DNA (RARE) y que se localizan en la región promotora de los genes modulados por el ácido retinoico. Allí actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de determinados genes.

Varios RAREs han sido hallados en el promotor del gen de la cadena de colágeno  $\alpha 2(I)$ . La unión de los RARs activados por ácido retinoico a estos elementos de respuesta producen una inhibición de la expresión de dicho gen, sin afectar a la expresión del gen de la cadena de colágeno  $\alpha 1(I)$  en células estelares hepáticas (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Otros autores, por el contrario, describen la inhibición por ácido retinoico de la transcripción del gen de la cadena  $\alpha 1(I)$  en fibroblastos humanos de pulmón (Krupsky *et al.*, 1994). Nuestros resultados encajan con estos hallazgos ya que la deficiencia de vitamina A aumenta el contenido de colágeno I intersticial y provoca la aparición de fibras de colágeno I en el interior de la MBA, y el tratamiento con ácido retinoico revierte estas alteraciones a la situación control.

En contra de nuestros resultados hay otros autores que observan una reducción del 50% en la cantidad de colágeno y de fibras elásticas en el parénquima pulmonar de ratas VAD, y una recuperación por ácido retinoico de la cantidad de colágeno, que sobrepasa en un 50% el valor de los controles, pero no de la elastina que no se recupera y permanece igual que en los animales deficientes en vitamina A (McGowan y Holmes, 2007). Hay varios motivos que pueden justificar las discrepancias entre sus resultados y los nuestros.

En primer lugar, el método de cuantificación que utilizan para medir el colágeno es un método basado en la diferencia de solubilidad que presentan el colágeno y la elastina en fenol, pero que valora todos los colágenos indiscriminadamente (McGowan y Holmes, 2007), mientras que nosotros además de medir hidroxiprolina, como indicador general de todos los colágenos, inmunodetectamos y cuantificamos en Western blot el colágeno I y el colágeno IV, y cuantificamos el mRNA de las cadenas  $\alpha$  que forman el colágeno I, el colágeno III y el colágeno IV por PCR cuantitativa en tiempo real, obteniendo datos más precisos e individualizados para cada colágeno.

Por otro lado, los modelos de deficiencia son distintos, nosotros ocasionamos una deficiencia más severa en las ratas, ya que desde el nacimiento de las crías las madres son alimentadas con dieta deficiente en vitamina A, y después del destete hasta los 60 días de vida continúan con esta misma dieta, mientras que en su estudio las mantienen hasta los 50 días de vida y durante la lactancia las madres son alimentadas con dieta control. Estas diferencias son importantes porque durante los 21 días de lactancia las crías de nuestro grupo VAD van recibiendo cada vez menos vitamina A en la leche, ya que las madres van reduciendo sus reservas, y como ya hemos dicho, los alveolos pulmonares se forman durante el periodo temprano de vida postnatal y continúan su desarrollo hasta la semana 6-7 de vida, requiriendo unos niveles adecuados de vitamina A, sobretodo, los primeros días de vida (Massaro y Massaro, 2002).

Además, existen otros autores que encuentran un aumento del colágeno total en los pulmones de ratas deficientes en vitamina A, esencialmente asociado a áreas de neumonitis intersticial con deposiciones de colágeno (Baybutt *et al.*, 2000).

No tenemos conocimiento de ningún trabajo, hasta el momento, que estudie la interacción entre los receptores de ácido retinoico y los promotores de las cadenas del colágeno IV, y la posible regulación de su expresión. Sin embargo, sabemos que los genes para las cadenas del colágeno IV se organizan en parejas orientados cabeza-cabeza, con un promotor corto separando las unidades de transcripción divergentes. Al menos tres factores nucleares (Sp1, la proteína de unión a CAAT y el factor de unión a CTC) son capaces de interactuar específicamente con los promotores de COL4A1 y COL4A2, así como con otros elementos localizados corriente abajo a lo largo del gen (Pollner *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha comprobado que los RARs interactúan físicamente con Sp1, modulando su unión al DNA (Shimada *et al.*, 2001). Por lo tanto, podría existir un efecto directo de la deficiencia en vitamina A sobre la expresión de colágeno IV.

Es necesario recalcar que el efecto corrector del ácido retinoico sobre las alteraciones de la MEC ocurre estando aumentado el estrés oxidativo, incluso más que en los animales VAD. En comparación con el grupo deficiente o el control de vehículo, en los pulmones VAD tratados con ácido retinoico encontramos duplicado el contenido de MDA, indicativo de un incremento en el estrés oxidativo. El incremento en MDA, provocado al administrar ácido retinoico, parece un resultado algo sorprendente debido al potencial antioxidante mostrado por los retinoides (Palace *et al.*, 1999). De todas maneras, distintos estudios realizados en células en cultivo han mostrado una acción prooxidante del ácido retinoico y de otros derivados de la vitamina A (Murata y Kawanashi, 2000; Gimeno *et al.*, 2004; Conte da Frota *et al.*, 2006). En este sentido y de acuerdo con nuestros resultados, se ha publicado recientemente que el ácido retinoico a concentraciones superiores a 1  $\mu\text{M}$  ejerce una acción prooxidantes en cultivos de células Sertoli de rata, probablemente por la generación de especies reactivas de oxígeno, que conducen a un aumento en la peroxidación lipídica, daño oxidativo del DNA y muerte celular (Conte da Frota *et al.*, 2006; Pasquali *et al.*, 2008), y en fibroblastos humanos concentraciones de retinol superiores a las fisiológicas también producen un incremento del estrés oxidativo (Gimeno *et al.*, 2004). En sentido contrario, pero *in vitro* con mitocondrias aisladas, se ha descrito una gran capacidad antioxidante del ácido retinoico (Das, 1989), que, por otra parte, no es extrapolable a *in vivo* como demuestran nuestros resultados.

El mecanismo por el cual el ácido retinoico induce peroxidación lipídica no está esclarecido completamente, pero, basándonos en los trabajos publicados existen varias

posibilidades. Al parecer, radicales superóxido y radicales centrados en carbono pueden generarse por autooxidación del ácido retinoico, proceso ya observado con retinol y retinal en cultivos celulares (Murata y Kawanashi, 2000). La elevada presión parcial de O<sub>2</sub> que hay en los pulmones podría potenciar el proceso (Palozza *et al.*, 1997). Adicionalmente, el ácido retinoico puede estimular la autooxidación, ya iniciada en la deficiencia de vitamina A, de ácidos grasos insaturados (Freyaldenhoven *et al.*, 1998), cuya concentración puede, a su vez, estar aumentada dado que el ácido retinoico activa el enzima Δ<sup>6</sup>-desaturasa (Alam *et al.*, 1984). Por último, el ácido retinoico o sus productos de degradación por oxidación pueden inhibir la fosforilación oxidativa, conduciendo a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (Siems *et al.*, 2002). Estos mecanismos podrían actuar simultáneamente.

El estrés oxidativo puede afectar a la conformación y/o a las actividades de muchas enzimas, receptores de membrana y proteínas que participan en la transducción de señales. Además, se ha visto que las especies reactivas de oxígeno, actuando como mensajeros intracelulares secundarios, son capaces de activar factores de transcripción, como el AP-1 (activated protein-1) e inducir la síntesis de la citoquina fibrogénica TGF-β<sub>1</sub> y de varias proteínas de la MEC. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta dos veces la síntesis de los colágenos I, III y IV en células mesangiales humanas a través de la activación del sistema TGF-β<sub>1</sub> (Iglesias-De la Cruz *et al.*, 2001). En consecuencia, la habilidad del ácido retinoico para restablecer las proteínas de la MEC, modificadas por la deficiencia de vitamina A, en presencia de un estrés oxidativo elevado indica que el ácido retinoico media estos efectos a través de su acción sobre los receptores nucleares y no como antioxidante.

Como hemos comentado en la introducción, la MB y en general la MEC no son estructuras estáticas y están continuamente renovándose (Bosman y Stamenkovic, 2003). En estos procesos de renovación intervienen las metaloproteasas de matriz (MMPs), una familia de 25 proteasas de secreción o presentes en la superficie celular, que degradan una gran variedad de proteínas extracelulares y de la superficie de las células en condiciones normales y patológicas (Greenlee *et al.*, 2007).

El hecho de que las MMPs se encarguen de la degradación y remodelación de la MB y la MEC, y además participen en una gran variedad de procesos patológicos pulmonares, nos decidió a analizar algunas MMPs y sus inhibidores endógenos, los

TIMPs. En nuestro estudio nos hemos centrado en MMP2 y MMP9, ya que ambas degradan específicamente colágeno IV (Sternlicht y Werb, 2001), son sintetizadas por diferentes tipos de células pulmonares, su expresión responde a estímulos extracelulares inductores o represores (Greenlee *et al.*, 2007), y ambas están implicadas en el desarrollo de distintas patologías que afectan a los pulmones y que cursan con alteraciones en la estructura y composición de la MB, como la bronqueolitis obliterans, la fibrosis pulmonar idiopática o el enfisema (Demedts *et al.*, 2005; Sagel *et al.*, 2005; Taghavi *et al.*, 2005; Greenlee *et al.*, 2007).

Nuestros resultados demuestran que las actividades de MMP2 y MMP9 aparecen disminuidas significativamente en los pulmones de animales sometidos a la dieta VAD. Sin embargo, sus inhibidores naturales TIMP1 y TIMP2 (Ogata *et al.*, 1995; Bernardo y Fridman, 2003) no ven alterados sus contenidos. El tratamiento de las ratas deficientes con ácido retinoico revirtió la actividad de la MMP9 al valor control, pero no lo hizo en el caso de la MMP2, ni de la pro-MMP2 que disminuyeron aún más. Este tratamiento tampoco produjo ningún efecto sobre el contenido de sus inhibidores.

En trabajos anteriores, se ha descrito una disminución de la cantidad y actividad de ambas gelatinasas en la deficiencia de vitamina A. En los riñones de ratas deficientes se han descrito alteraciones en la MB renal semejantes a las que hemos encontrado en los pulmones de nuestros animales, y el contenido y la actividad de la MMP2 y la MMP9 también aparecían disminuidos (Marín *et al.*, 2005). De forma similar, en la córnea de ratas deficientes en vitamina A se encontraron también disminuidas las dos gelatinasas, y este descenso se relacionó con alteraciones en la transparencia de la córnea y con el aumento en la susceptibilidad de la córnea a ulceraciones que se observa en estos animales (Twining *et al.*, 1997). En ambos casos y en coincidencia con nuestra situación, la deficiencia disminuye las dos metaloproteasas.

Por otro lado, se ha publicado que los retinoides, vía ácido retinoico inducen selectivamente la expresión de la MMP9 a través del RAR $\alpha$  y no de la MMP2, aumentando su actividad, medida por zimografía, en glándula mamaria de rata (Zaragozá *et al.*, 2007). En células de neuroblastoma SKNB también se ha visto cómo el ácido retinoico aumenta los niveles de mRNA y de proteína de la MMP9 únicamente, y no de la MMP2 (Chambaut-Guérin *et al.*, 2000), lo que estaría de acuerdo con que en nuestras ratas se

recupere la MMP9 al tratar con ácido retinoico y no la MMP2. Pero, en contra de estos resultados y exclusivamente en cultivos celulares, otros autores demuestran que el ácido retinoico inhibe selectivamente la expresión de la MMP9 en células provenientes de lavado broncoalveolar, o incluso produce una disminución tanto de la MMP9 como de la MMP2 en células endoteliales microvasculares (Braunhut y Moses, 1994; Frankenberger *et al.*, 2001).

Sorprendentemente, en diversos procesos fibróticos y en otras patologías pulmonares en los que se han visto deposiciones de colágeno, elastina y otros componentes de la MEC, se han encontrado aumentadas estas y/u otras metaloproteasas (Zuo *et al.*, 2002; Demedts *et al.*, 2005; Kasai *et al.*, 2005; Molet *et al.*, 2005). Aunque también se han descrito distintas situaciones en las que MMP2 y MMP9 están disminuidas en los pulmones, por ejemplo situaciones de hiperoxia e hipoxia en las que las paredes de las arterias pulmonares se ven engrosadas (Hosford *et al.*, 2004; Ambalavanan *et al.*, 2008).

Si atendemos al posible efecto de los retinoides sobre la expresión de los TIMPs *in vivo*, disponemos de poca información, aunque en un estudio con pacientes afectos de enfisema, se comprobó que la administración de ácido retinoico no producía ningún efecto de importancia, ni variaba de forma significativa el nivel de ambos inhibidores en plasma (Mao *et al.*, 2003). Por el contrario, en el estudio con células cultivadas de lavado broncoalveolar, citado anteriormente, en el que la MMP9 sufría una disminución de su expresión al tratar con ácido retinoico, el inhibidor TIMP1 se veía aumentado. Sin embargo, en este trabajo nunca se midió la actividad colagenolítica de la MMP9 y por tanto no se puede saber cual era la situación proteolítica real (Frankenberger *et al.*, 2001). En otros tipos celulares se han descrito situaciones muy diversas en respuesta al ácido retinoico. Por ejemplo, en células dendríticas mieloides tratadas con ácido retinoico está aumentada la expresión de MMP9 de forma llamativa mientras que TIMP1 no se ve afectado; por el contrario en fibroblastos humanos la adición de ácido retinoico junto con factor de crecimiento de fibroblastos induce la expresión de TIMP1 (Bigg *et al.*, 2000; Lackey *et al.*, 2008).

Según nuestros resultados, la importante disminución de la actividad de las MMPs que encontramos en los animales con deficiencia en vitamina A, unido a que sus inhibidores no varían, conlleva una menor potencia colagenolítica en la MEC pulmonar,

lo cual puede ser un factor adicional contribuyente al aumento en el contenido de colágeno IV y la deposición de colágeno I encontrados en la MBA de estos animales, así como del incremento detectado en el contenido de colágeno I en la MEC. Además, el hecho de que al tratar con ácido retinoico la MMP2 no se recupere y la MMP9 sí lo haga, es indicativo de que el potencial se mantiene disminuido y por tanto, puede ser un factor adicional contribuyente al hecho de que el contenido en hidroxiprolina no descienda al valor de los animales control y el grosor de la MBA no se recupere completamente.

En resumen, basándonos en nuestros resultados y los publicados por otros, sugerimos los siguientes acontecimientos como un posible mecanismo para las alteraciones descritas. El estrés oxidativo ocasionado por la deficiencia de vitamina A activa la producción de TGF- $\beta_1$ , probablemente por la activación de leucocitos y mediado por activación/lesión epitelial-endotelial (Broekelmann *et al.*, 1991; Iglesias-De la Cruz *et al.*, 2001). El TGF- $\beta_1$ , por acción paracrina, induce la expresión en fibroblastos y células epiteliales-endoteliales de los colágenos tipo I y tipo IV (Fine y Goldstein, 1987; Douthwaite *et al.*, 1999; Iglesias-De la Cruz *et al.*, 2001). Además, este efecto podría estar potenciado por la ausencia de ácido retinoico. Tras su administración, el ácido retinoico contrarresta la acción del TGF- $\beta_1$  a dos niveles distintos, reprimiendo su síntesis (Morath *et al.*, 2001) e interfiriendo con la ruta de señalización TGF- $\beta_1$ /Smad (Pendaries *et al.*, 2003). Los receptores de ácido retinoico actuarían como activadores de la ruta TGF- $\beta_1$ /Smad en los pulmones de la ratas deficientes en vitamina A y como inhibidores en los pulmones de los animales tratados con ácido retinoico (Pendaries *et al.*, 2003). Además, el ácido retinoico estaría modulando directamente la expresión de las proteínas de la MEC, a través de su unión a los RARs o del efecto de éstos sobre otros factores de transcripción (Krupsky *et al.*, 1994; Pollner *et al.*, 1997; Shimada *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). La ausencia del ácido retinoico reduce la actividad de las MMPs, cuya expresión es activada por él mismo a través de los RAR (Zaragozá *et al.*, 2007), y reduce la expresión de las lamininas, en las que se han descrito RAREs en los promotores de sus genes (Vasios *et al.*, 1989; Li y Gudas, 1996); y en consecuencia, el tratamiento con ácido retinoico activa la expresión de estos componentes.

Nuestro estudio proporciona nuevos datos sobre los efectos que la deficiencia crónica de vitamina A produce, durante el periodo de crecimiento, en la estructura y la composición de la MEC pulmonar, y muestra que la administración de ácido retinoico

reverte gran parte de las alteraciones descritas. Más en concreto, este trabajo demuestra que la deficiencia de vitamina A tiene como consecuencia la aparición de anomalías en la MEC pulmonar, como una MBA que duplica su grosor, incrementos similares a este en la cantidad total de colágeno I y IV, y la aparición de fibrillas de colágeno en el interior de la MBA. Además, se ve modificada la proporción de las cadenas  $\alpha$  que componen la molécula de colágeno IV, y de las cadenas de laminina  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  tanto a nivel de cantidad de mRNAs, como de cantidad de proteína. De igual modo, se producen cambios en los mRNAs de las cadenas  $\alpha$  del colágeno I y de las cadenas de laminina  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$ . Finalmente, la deficiencia de vitamina A conduce a una disminución de la actividad proteolítica de las metaloproteasas 2 y 9. Todos estos cambios de la MEC van acompañados de incrementos en la actividad MPO, en el contenido de TGF- $\beta_1$  activo y en la producción de malondialdehído.

El tratamiento con ácido retinoico restablece la mayoría de las alteraciones observadas en los animales VAD a la situación control, salvo el engrosamiento de la MBA que se recupera solo parcialmente, las cadenas de laminina  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$ , y la actividad de la MMP2 que no se recuperan, y el MDA que se incrementa. Las anomalías inducidas por la deficiencia de vitamina A en la MEC pulmonar son hallazgos comunes encontrados en pacientes con enfermedades fibróticas (Magro *et al.*, 2005; Magro *et al.*, 2006) sugiriéndolas como posibles estadios patogénicos tempranos, y un factor que contribuye al desarrollo de estas enfermedades. De nuestros resultados hay que resaltar la capacidad del ácido retinoico para corregir las alteraciones de la MEC incluso existiendo un alto grado de estrés oxidativo. A pesar de este hecho hay que tener en cuenta que el tratamiento con cantidades moderadas de ácido retinoico, al menos en los pulmones deficientes en vitamina A, aumenta considerablemente el estrés oxidativo pudiendo desembocar en efectos perjudiciales no deseados.

Por último, las similitudes entre las alteraciones encontradas en la MB pulmonar de ratas deficientes en vitamina A y las descritas por nuestro mismo grupo en la MB renal de ratas VAD (Marín *et al.*, 2005) indican que estas alteraciones pueden ser un factor de patogenicidad común en los estados de deficiencia de vitamina A.

## **CONCLUSIONES**

## 1. Conclusiones

1. La deficiencia de vitamina A desencadena alteraciones en la ultraestructura de la membrana basal alveolar. Se trata de un incremento del grosor, una desestructuración de su morfología y la presencia de abundantes fibrillas de colágeno I dentro de su estructura.

2. Las alteraciones ultraestructurales de las MBs alveolares en los animales VAD van acompañadas de cambios en la cantidad y composición de proteínas que las forman. La cantidad de colágeno IV aparece aumentada significativamente mientras que la de las lamininas está disminuida. La composición del colágeno IV se ve modificada por la deficiencia de vitamina A, aunque el cambio no es igual en todas las cadenas  $\alpha$ , ni a nivel cuantitativo ni cualitativo, las cadenas  $\alpha 1(\text{IV})$ ,  $\alpha 3(\text{IV})$  y  $\alpha 4(\text{IV})$  aumentan su contenido, mientras que las cadenas  $\alpha 2(\text{IV})$  y  $\alpha 5(\text{IV})$  no varían.

3. La deficiencia en vitamina A produce una disminución en la actividad proteolítica de las metaloproteasas MMP2 y MMP9. Sin embargo, sus inhibidores tisulares, TIMP1 y TIMP2 no modifican su contenido en este déficit vitamínico.

4. El colágeno I duplica su contenido por efecto de la deficiencia en vitamina A, apareciendo abundantes acúmulos de fibrillas de colágeno en la matriz extracelular.

5. La correlación entre los cambios sufridos en las proteínas de la MEC pulmonar y sus correspondientes mRNAs indica que la deficiencia de vitamina A y el tratamiento posterior con ácido retinoico actúan a nivel del mRNA, pudiendo afectar a la transcripción de los genes de las cadenas de colágeno I, colágeno IV y laminina, o a la estabilidad de los propios mRNAs o a ambas.

6. La deficiencia en vitamina A incrementa el estrés oxidativo pulmonar, desencadena un proceso de infiltración leucocitaria y aumenta la liberación de TGF- $\beta_1$ .

7. Los efectos de la deficiencia de vitamina A en la ultraestructura y composición de la MBA y MEC pulmonar se revierten con el tratamiento con ácido retinoico a la situación control, excepto el engrosamiento de la MBA que se recupera parcialmente, las cadenas  $\alpha$  de laminina y la actividad de la MMP2 que no se recuperan, y el estrés oxidativo que se agudiza aún más.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Adachi E, Hopkinson I, and Hayashi T. (1997) Basement-membrane stromal relationships: interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *Int Rev Cytol* 173: 73-156.
- Abdelmalek M & Spencer J (2006) Retinoids and wound healing. *Dermatol Surg* 32: 1219-30.
- Abrahamson DR (1986) Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol* 149: 257-78.
- Aird FK, Greene SA, Ogston SA, Macdonald TM, Mukhopadhyay S (2006) Vitamin A and lung function in CF. *J Cyst Fibros* 5: 129-131.
- Alam SQ, Alam BS, Chen TW (1984) Activities of fatty acid desaturases and fatty acid composition of liver microsomes in rats fed  $\beta$ -carotene and 13-cis retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 792: 110-7.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell 4th Edition. Garland Science.
- Ambalavanan N, Nicola T, Li P, Bulger A, Murphy-Ullrich J, Oparil S, Chen YF (2008) Role of matrix metalloproteinase-2 in newborn mouse lungs under hypoxic conditions. *Pediatr Res* 63: 26-32.
- Antipatis C, Ashworth CJ, Grant G, Lea RG, Hay SM, Rees WD (1998) Effects of maternal vitamin A status on fetal heart and lung: changes in expression of key developmental genes. *Am J Physiol lung Cell Mol Physiol* 275: L1184-L1191.
- Argraves WS, Dickerson K, Burgess WH, Ruoslahti E (1989) Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor beta subunit cytoplasmic domain. *Cell* 58: 623-629.
- Argraves WS, Tran H, Burgess WH, Dickerson K (1990) Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *J Cell Biol* 111: 3155-3164.
- Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier A (1991) Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 572: 103-116.
- Aumailley M (1995) Structure and supramolecular organization of basement membranes. *Kidney Int Suppl* 49: S4-7.
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M,

- Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD (2005) A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24: 326-32.
- Aumailley M, Wiedemann H, Mann K, Timpl R (1989) Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur J Biochem* 184: 241-248.
- Ball JA & Young KR Jr (1998) Pulmonary manifestations of Goodpasture's syndrome. Antiglomerular basement membrane disease and related disorders. *Clin Chest Med* 19: 777-91.
- Barber T, Borrás E, Torres L, García C, Cabezuelo F, Lloret A, Pallardó FV, Viña JR (2000) Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic Biol Med* 29: 1-7.
- Barua AB & Olson JA (2000)  $\beta$ -Carotene is converted primarily to retinoids in rats in vivo. *J Nutr* 130: 1996-2001.
- Bastien J & Rochette-Egly C (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328: 1-16.
- Battaglia C, Mayer U, Aumailley M, Timpl R (1992) Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur J Biochem* 208: 359-366.
- Baybutt RC, Hu L, Molteni A (2000) Vitamin A deficiency injures lung and liver parenchyma and impairs function of rat type II pneumocytes. *J Nutr* 130: 1159-65.
- Baybutt RC & Molteni A (2007) Vitamin A and emphysema. *Vitam Horm* 75: 385-401.
- Bendich A & Langseth L (1989) Safety of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 49: 358-371.
- Bennett DLH, Webster GJM, Molyneux P, Descamps MJL, Plant GT, Perreira SP, Reilly MM (2004) The world through tinted glasses. *The lancet* 364: 368.
- Berdanier CD (2001) Diabetes and nutrition: the mitochondrial part. *Jour Nutr* 131: 344S-353S.
- Bergijk EC, Van Alderwegen IE, Baelde HJ, De Heer E, Funabiki K, Miyai H, Killen PD, Kalluri RK, Bruijn JA (1998) Differential expresión of collagen IV isoforms in experimental glomeruloesclerosis. *J Pathol* 184: 307-315.
- Bernard PS & Wittwer CT (2002) Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 48: 1178-85.

- Bernardo MM & Fridman R (2003) TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J* 374: 739-45.
- Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68: 729-7.
- Bhaskaran M, Kolliputi N, Wang Y, Gou D, Chintagari NR, Liu L (2007) Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor beta 1 through the Smad pathway. *J Biol Chem* 282: 3968-76.
- Biesalski HK & Nohr D (2003) Importance of vitamin-A for lung function and development. *Mol Aspects Med* 24: 431-40.
- Bigg HF, McLeod R, Waters JG, Cawston TE, Clark IM (2000) Mechanisms of induction of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) gene expression by all-trans retinoic acid in combination with basic fibroblast growth factor. *Eur J Biochem* 267: 4150-6.
- Birk DE & Trelstad RL (1984) Extracellular compartments in matrix morphogenesis: collagen fibril, bundle, and lamellar formation by corneal fibroblasts. *J Cell Biol* 99: 2024-2033.
- Bloom W & Fawcett DW (1978) "Tratado de Histología" 7ª ed. Editorial Labor S.A.
- Borrás E, Zaragozá R, Morante M, García C, Gimeno A, López-Rodas G, Barber T, Miralles VJ, Viña JR, Torres L (2003) In vivo studies of altered expression patterns of p53 and proliferative control genes in chronic vitamin A deficiency and hypervitaminosis. *Eur J Biochem* 270: 1493-501.
- Bosch X & Font J (1999) The pulmonary-renal syndrome: a poorly understood clinicopathologic condition. *Lupus* 8: 258-62.
- Bosman FT & Stamenkovic I (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200: 423-428.
- Bourdon MA, Shiga M, Ruoslahti E (1987) Gene expression of the chondroitin sulfate proteoglycan core protein PG19. *Mol Cell Biol* 7: 33-40.
- Boyd CD, Toth-Fejöl SE, Gadi IK, Litt M, Condon MR, Kolbe M, Hagen IK, Kurkinen M, Mackenzie JW, Magenis E (1988) The genes coding for human pro alpha 1(IV) collagen and pro alpha 2(IV) collagen are both located at the end of the long arm of chromosome 13. *Am J Hum Genet* 42: 309-314.

- Boylan JF, Lohnes D, Taneja R, Chambon P, Gudas LJ (1993) Loss of retinoic acid receptor gamma function in F9 cells by gene disruption results in aberrant Hoxa-1 expression and differentiation upon retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9601-9605.
- Braunhut SJ & Moses MA (1994) Retinoids modulate endothelial cell production of matrix-degrading proteases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). *J Biol Chem* 269: 13472-9.
- Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR (1990) Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 507-511.
- Brodeur AC, Wirth DA, Franklin CL, Reneker LW, Miner JH, Phillips CL (2007) Type I collagen glomerulopathy: postnatal collagen deposition follows glomerular maturation. *Kidney Int* 71: 985-93.
- Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA (1991) Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6642-6.
- Burgeson RE (1988) New collagens, new concepts. *Annu Rev Cell Biol* 4: 551-77.
- Cabrera Navarro P & Rodriguez de Castro F (2005) Manual de enfermedades respiratorias 2ª ed. Unión internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias.
- Cardoso WV, Williams MC, Mitsialis SA, Joyce-Brady M, Rishi AK, Brody JS (1995) Retinoic acid induces changes in the pattern of airway branching and alters epithelial cell differentiation in the developing lung in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 464-476.
- Carlin B, Jaffe R, Bender B, Chung AE (1981) Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem* 256: 5209-5214.
- Carlson EC, Audette JL, Veitenheimer NJ, Risan JA, Laturus DI, Epstein PN (2003) Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice. *Anat rec Part A, discov mol cell evol biol* 271: 332-41.
- Catusse C, Polette M, Coraux C, Burlet H, Birembaut P (2000) Modified basement membrane composition during bronchopulmonary tumor progression. *J Histochem Cytochem* 48: 663-9.
- Chambaut-Guérin AM, Hérigault S, Rouet-Benzineb P, Rouher C, Lafuma C (2000) Induction of matrix metalloproteinase MMP-9 (92-kDa gelatinase) by retinoic

- acid in human neuroblastoma SKNBE cells: relevance to neuronal differentiation. *J Neurochem* 74: 508-17.
- Champliaud MF, Virtanen I, Tiger CF, Korhonen M, Burgeson R, Gullberg D (2000) Posttranslational modifications and beta/gamma chain associations of human laminin alpha1 and laminin alpha5 chains: purification of laminin-3 from placenta. *Exp Cell Res* 259: 326-35.
- Chomczynsky P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res* 20: 1717-23.
- Chung AE, Jaffe R, Freeman IL, Vergnes JP, Braginski JE, Carlin B (1979) Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell* 16: 277-287.
- Chytil F (1996) Retinoids in lung development. *FASEB J* 10: 986-992.
- Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement. *J Biol Chem* 263: 6579-6587.
- Collier IE, Bruns GA, Goldberg GI, Gerhard DS (1991) On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 9: 429-434.
- Colognato H & Yurchenco PD (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218: 213-234.
- Comper WD (1996) Extracellular matrix. Vol 1 and Vol 2, Harwood academic publishers.
- Conte da Frota ML Jr, Gomes da Silva E, Behr GA, Roberto de Oliveira M, Dal-Pizzol F, Klamt F, Moreira JC (2006) All-trans retinoic acid induces free radical generation and modulate antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells. *Mol Cell Biochem* 285: 173-9.
- Cooper ME, Bonnet F, Oldfield M, Jandeleit-Dahm K (2001) Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypertens* 14: 475-486.

- Cox S (1999) A review of the roles of vitamin A in the immune system: implications for vitamin A deficiency in the pathology and vertical transmission of the human immunodeficiency virus. <http://nutrition.cabweb.org/NARA/Fulltext/HIV.htm>
- Cruz E & Moreno R (2007) Aparato respiratorio. Fisiología y clínica. 5ª edición Universidad Católica de Chile.
- Cutroneo KR, White SL, Phan SH, Ehrlich HP (2007) Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *J Cell Physiol* 211: 585-9.
- Das NP (1989) Effects of vitamin A and its analogs on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *J Neurochem* 52: 585-8.
- David G (1993) Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J* 7: 1023-1030.
- De Blas AL & Cherwinski HM (1983) Detection of antigen on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal Biochem* 133: 214-219.
- De Luca LM, Darwiche N, Celli G, Kosa K, Jones C, Ross C, Chen LC (1994) Vitamin A en epithelial differentiation and skin carcinogenesis. *Nutr Rev* 52: S45-52.
- De Muro P, Fresu P, Formato M, Tonolo G, Mameli M, Maioli M, Sanna GM, Cherchi GM (2002) Urinary glycosaminoglycan and proteoglycan excretion in normoalbuminuric patients with type 1 diabetes mellitus. *J Nephrol* 15: 290-296.
- Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA (2005) Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* 5: 257-263.
- Dewald B & Baggiolini M (1986) Methods for assessing exocytosis by neutrophil leukocytes. *Methods Enzymol* 132: 267-277.
- Dietz U, Aigner T, Bertling WM, Von der Mark K (1993) Alterations of collagen mRNA expression during retinoic induced chondrocyte modulation: Absence of untranslated alpha 1(I) mRNA in hyaline chondrocytes. *J Cell Biochem* 52: 57-68.
- Docherty AJ, Lyonsm A, Smithm BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, Murphy G, Reynolds JJ (1985) Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318: 66-69.
- Donnelly BI (1996) Vitamin A and respiratory syncytial virus infection. *Arch Pediatr Adolesc Med* 150: 882-92.
- Douthwaite JA, Johnson TS, Haylor JL, Watson P, El Nahas AM (1999) Effects of transforming growth factor-beta1 on renal extracellular matrix components and their regulating proteins. *J Am Soc Nephrol* 10: 2109-19.

- Downie D, Antipatis C, Delday MI, Maltin CA, Sneddon AA (2005) Moderate maternal vitamin A deficiency alters myogenic regulatory protein expression and perinatal organ growth in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R73-9.
- Duester G (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 267: 4315-24.
- Dunsmore SE, Lee YC, Martinez-Williams C, Rannels DE (1996) Synthesis of fibronectin and laminin by type II pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol* 270: L215-23.
- Dunsmore SE & Rannels DE (1996) Extracellular matrix biology in the lung. *Am J Physiol* 270: L3-27.
- Durham PL & Snyder JM (1995) Characterization of alpha 1, beta 1, and gamma 1 laminin subunits during rabbit fetal lung development. *Dev Dyn* 203: 408-421.
- Durham PL & Snyder JM (1996) Regulation of the beta 2 subunit chain of laminin in developing rabbit fetal lung tissue. *Differentiation* 60: 229-243.
- Ebihara I, Suzuk S, Nakamura T, Fukui M, Yaguchi Y, Tomino Y, Koide H (1993) Extracellular matrix component mRNA expression in glomeruli in experimental focal glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 3: 1387-1397.
- Ekblom P, Ekblom M, Fecker L, Klein G, Zhang HY, Kadoya Y, Chu ML, Mayer U, Timpl R (1994) Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Development* 120: 2003-2014.
- Eklund L, Piuhola J, Komulainen J, Sormunen R, Ongvarrasopone C, Fässler R, Muona A, Ilves M, Ruskoaho H, Takala TE, Pihlajaniemi T (2001) Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1194-9.
- Emanuel BS, Sellinger BT, Gudas LJ, Myers J (1986) Localization of the human procollagen alpha 1(IV) gene to chromosome 13q34 by in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 38: 38-44.
- Erickson AC & Couchman JR (2000) Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 48: 1291-1306.
- Estornell E, Tormo JR, Marín P, Renau-Piqueras J, Timoneda J, Barber T (2000) Effects of vitamin A deficiency on mitochondrial function in rat liver and heart. *British J Nutr* 84: 927-934.
- Evans TRJ & Kaye SB (1999) Retinoids: present role and future potential. *British J Cancer* 80: 1-8.

- Evarts RP, Hu Z, Omori N, Omori M, Marsden ER, Thorgeirsson S.S.(1995) Effect of vitamin A deficiency on the integrity of hepatocytes after partial hepatectomy. *Am J Pathol* 147: 699-706.
- Federspiel SJ, DiMari SJ, Howe AM, Guerry-Force ML, Haralson MA (1991) Extracellular matrix biosynthesis by cultured fetal rat lung epithelial cells. IV. Effects of chronic exposure to retinoic acid on growth, differentiation, and collagen biosynthesis. *Lab Invest* 65: 441-450.
- Fine A & Goldstein RH (1987) The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem* 262: 3897-902.
- Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, Darcy EM, Masterson JB, FitzGerald MZ, O'Connor CM (1997) Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax* 52: 502-506.
- Fisher GJ & Voorhes JJ (1996) Molecular mechanisms of retinoid action in skin. *FASEB J* 10: 1002-1013.
- Fleischmajer R, Gay S, Perlish JS, Cesarini JP (1980) Immunoelectron microscopy of type III collagen in normal and scleroderma skin. *J Invest Dermatol* 75: 189-91.
- Forget MA, Desrosiers RR, Béliveau R Physiological (1999) roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 77: 465-80.
- Frank DE & Carter WG (2004) Laminin 5 deposition regulates keratinocyte polarization and persistent migration. *J Cell Sci* 117: 1351-1363.
- Frankenberger M, Hauck RW, Frankenberger B, Häussinger K, Maier KL, Heyder J, Ziegler-Heitbrock HW (2001) All trans-retinoic acid selectively down-regulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in human bronchoalveolar lavage cells. *Mol Med* 7: 263-70.
- Freyaldenhoven MA, Lehman PA, Franz TJ, Lloyd RV, Samokyszyn VM (1998) Retinoic acid-dependent stimulation of 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-initiated autoxidation of linoleic acid in sodium dodecyl sulfate micelles: a novel prooxidant effect of retinoic acid. *Chem Res Toxicol* 11: 102-10.
- Furr HC & McGrane MM. (2003) Retinol physiology 4957-67. From Encyclopedia of food science and nutrition.

- Furuyama A & Mochitate K (2004) Hepatocyte growth factor inhibits the formation of the basement membrane of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L939-46.
- Gardner EM & Ross AC (1993) Dietary vitamin A restriction produces marginal vitamin A status in young rats. *J Nutr* 123: 1435-1443.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T (2003) Collagens: structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1531-46.
- Gengrinovitch S, Berman B, David G, Witte L, Neufeld G, Ron D (1999) Glypican-1 is a VEGF<sub>165</sub> binding proteoglycan that acts as an extracellular chaperone for VEGF<sub>165</sub>. *J Biol Chem* 274: 10816-22.
- Gimeno A, Zaragoza R, Vivó-Sesé I, Viña JR, Miralles VJ (2004) Retinol, at concentrations greater than the physiological limit, induces oxidative stress and apoptosis in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 13: 45-54.
- Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He CS (1989) Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8207-8211.
- Goodpasture EW (1919) The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of pneumonia. *Am J Med Sci* 158: 863-870.
- Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F (2007) Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 87: 69-98.
- Griffiths CE, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, Voorhees JJ (1993) Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *N Engl J Med* 329: 530-535.
- Grumelli S, Corry D, Song L, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis D, Kheradmand F (2004) An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *Public Library Sci Med* 1: 74-83.
- Guazzi M, Oreglia I, Guazzi MD (2002) Insulin improves alveolar-capillary membrane gas conductance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25: 1802-6.
- Gunwar S, Ballester F, Kalluri R, Timoneda J, Chonko AM, Edwards SJ, Noelken ME, Hudson BG (1991) Glomerular basement membrane. Identification of dimeric subunits of the noncollagenous domain (hexamer) of collagen IV and the Goodpasture antigen. *J Biol Chem* 266: 15318-24.

- Guvener N, Tutuncu NB, Akcay S, Eyuboglu F, Gokcel A (2003) Alveolar gas exchange in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J* 50: 663-7.
- Haegens A, Vernooij JHJ, Heeringa P, Mossman BT, Wouters EFM (2008) Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents. *Eur Respir J* 31: 252-60.
- Hägg PM, Muona A, Liétard J, Kivirikko S, Pihlajaniemi T (1998) Complete exon-intron organization of the human gene for the alpha1 chain of type XV collagen (COL15A1) and comparison with the homologous COL18A1 gene. *J Biol Chem* 273: 17824-31.
- Hanley TM, Kiefer HL, Schnitzler AC, Marcello JE, Viglianti GA (2004) Retinoid-dependent restriction of human immunodeficiency virus type 1 replication in monocytes/macrophages. *J Virol* 78: 2819-2830.
- Hansen LA, Sigman CC, Adreola F, Ross SA, Kelloff GJ, De Luca LM (2000) Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* 21: 1271-1279.
- Harbige LS (1996) Nutrition and immunity with emphasis on infection and autoimmune disease. *Nutr Health* 10: 285-312.
- Haskell MJ, Jamil KM, Hassan F, Peerson JM, Hossain MI, Fuchs GJ, Brown KH (2004) Daily consumption of indian spinach (*Basella alba*) or sweet potatoes has a positive effect on total-body vitamin A stores in Bangladeshi men. *Am J Clin Nutr* 80: 705-714.
- Hassell JR, Robey PG, Barrach HJ, Wilczek J, Rennard SI, Martin GR (1980) Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4494-8.
- Hay ED (1991) "Cell biology of extracellular matrix" 419-462 (Hay, E.D. ed.) Plenum press New York.
- Hayat MA (1992) Quantitation of immunogold labelling. *Micron* 23: 1-16.
- He GA, Luo JX, Zhang TY, Wang FY, Li RF (2003) Canstatin-N fragment inhibits in vitro endothelial cell proliferation and suppresses in vivo tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 801-5.
- Heinz C, Steuhl KP, Meller D (2004) Corneal perforation associated with vitamin A deficiency. *Der Ophthalmologe* 101: 614.
- Hoegy SE, Oh HR, Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG (2001) Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem* 276: 3203-3214.

- Hofmann H, Voss T, Kühn K, Engel J (1984) Localization of flexible sites in thread-like molecules from electron micrographs. Comparison of interstitial, basement membrane and intima collagens. *J Mol Biol* 17: 325-343.
- Hosford GE, Fang X, Olson DM (2004) Hyperoxia decreases matrix metalloproteinase-9 and increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 protein in the newborn rat lung: association with arrested alveolarization. *Pediatr Res* 56: 26-34.
- Hoshino M, Nakamura Y, Sim J, Shimojo J, Isogai S (1998) Bronchial subepithelial fibrosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 102: 783-788.
- Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB, Tryggvason K (1990) Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1606-1610.
- Hudson BG, Reenders ST, Tryggvason K (1993) Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268: 26033-26036.
- Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG (2003) Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome and type IV collagen. *N Engl J Med* 348: 2543-56.
- Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K (1990a) Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 265: 11077-11082.
- Huhtala P, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Tryggvason K (1990b) Completion of the primary structure of the human type IV collagenase preproenzyme and assignment of the gene (CLG4) to the q21 region of chromosome 16. *Genomics* 6: 554-559.
- Hunt TK (1986) Vitamin A and wound healing. *J Am Acad Dermatol* 15: 817-21.
- Huszar G, Maiocco J, Naftolin F, (1980) Monitoring of collagen and collagen fragments in chromatography of protein mixtures. *Anal Biochem* 105: 424-9.
- Hutter H, Vogel BE, Plenefisch JD, Norris CR, Proenca RB, Spieth J, Guo C, Mastwal S, Zhu X, Scheel J, Hedgecock EM (2000) Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* 287: 989-994.
- Hynes RO & Zhao Q (2000) The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol* 150: F89-96.
- Iglesias-De la Cruz MC, Ruiz-Torres P, Alcamí J, Díez-Marques L, Ortega-Velázquez R, Chen S, Rodríguez-Puyol M, Ziyadeh FN, Rodríguez-Puyol D (2001) Hydrogen

- peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF-beta in human mesangial cells. *Kidney Int* 59: 87-95.
- Iozzo RV (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67: 609-52.
- Ishizuka, I (1997) Chemistry and functional distribution of sulfoglycolipids. *Prog Lipid Res* 36: 245-319.
- Ivanyi B & Degrell P (2004) Fibrillary glomerulonephritis and immunotactoid glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2166-70.
- Ivanyi B, Fahmy H, Brown H, Szenohradszky P, Halloran PF, Solez K (2000) Peritubular capillaries in chronic renal allograft rejection: a quantitative ultrastructural study. *Hum Pathol* 31: 1129-38.
- Jacobi J, Kristal B, Chezar J, Shaul SM, Sela S (2005) Exogenous superoxide mediates prooxidative, proinflammatory, and procoagulatory changes in primary endothelial cell cultures. *Free Radic Biol Med* 39: 1238-48.
- Jacobi J, Sela S, Cohen HI, Chezar J, Kristal B (2006) Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H2051-8.
- Janoff A (1985) Elastases and emphysema: current assessment of protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis* 132: 417-433.
- Jarad G, Cunningham J, Shaw AS, Miner JH (2006) Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*<sup>-/-</sup> mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. *J Clin Invest* 116: 2272-9.
- Jeffery PK, Laitinen A, Venge P (2000) Biopsy markers of airway inflammation and remodelling. *Respir Med* 94: Suppl F S9-15.
- Jiang X & Couchman JR (2003) Perlecan and tumor angiogenesis. *J Histochem Cytochem* 51: 1393-1410.
- Jones JG, Minty BD, Lawler P, Hulands G, Crawley JC, Veall N (1980) Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. *Lancet* 66-68.
- Junquiera LC & Carneiro J (2005) The respiratory system. From Basic Histology: text and atlas, 11th Edition. The McGraw-Hill Companies.
- Jutley JK, Wood EJ, Cunliffe WJ (1993) Influence of retinoic acid and TGF-beta on dermal fibroblast proliferation and collagen production in monolayer cultures and dermal equivalents. *Matrix* 13: 235-241.

- Kajimura D, Takahashi S, Yoshikawa K, Hattori S, Sado Y, Imamura Y, Hayashi T (2004) Non-helical type IV collagen polypeptides in human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 11-6.
- Kallunki P & Tryggvason K (1992) Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Cell Biol* 116: 559-71.
- Kalluri R (2002) Discovery of type IV collagen non-collagenous domains as novel integrin ligands and inhibitors of angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67: 255-66.
- Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3: 422-433.
- Kalluri R & Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112: 1776-1784.
- Kamagata Y, Mattei MG, Ninomiya Y (1992) Isolation and sequencing of cDNAs and genomic DNAs encoding the alpha 4 chain of basement membrane collagen type IV and assignment of the gene to the distal long arm of human chromosome 2. *J Biol Chem* 267: 23753-23758.
- Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z (2005) TGF-beta 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 6: 56.
- Kasinath BS, Singh AK, Kanwar YS, Lewis EJ (1990) Dexamethasone increases heparan sulfate proteoglycan core protein content of glomerular epithelial cells. *J Lab Clin Med* 115: 196-202.
- Katayama M & Sekiguchi K (2004) Laminin-5 in epithelial tumour invasion. *J Mol Histol* 35: 277-286.
- Kawakami Y, Raya A, Raya RM, Rodriguez-Esteban C, Izpisua JC (2005). Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature* 435: 165-171.
- Kelly PT & Haponik EF (1994) Goodpasture's syndrome: Molecular and clinical advances. *Medicine* 73: 171-185 .
- Kheradmand F & Rishi K (2003) The Role of Proteinases in Airway Remodeling. New York: Dekker, p. 749-765137.

- Khoshnoodi J, Cartiailler JP, Alvares K, Veis A, Hudson BG (2006a) Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *J Biol Chem* 281: 38117-21.
- Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Cartiailler JP, Bondar O, Sundaramoorthy M, Hudson BG (2006b) Mechanism of chain selection in the assembly of collagen IV: a prominent role for the alpha2 chain. *J Biol Chem* 281: 6058-69.
- Kikkawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K (1998) Isolation and characterization of laminin-10/11 secreted by human lung carcinoma cells. laminin-10/11 mediates cell adhesion through integrin alpha3 beta1. *J Biol Chem* 273: 15854-9.
- Kimura N, Toyoshima T, Kojima T, Shimane M (1998) Entactin-2 a new member of basement membrane protein with high homology to entactin/nidogen. *Exp Cell Res* 241: 36-45.
- Kleinman HK, Ebihara I, Killen PD, Sasaki M, Cannon FB, Yamada Y, Martin GR (1987) Genes for basement membrane proteins are coordinately expressed in differentiating F9 cells but not in normal adult murine tissues. *Dev Biol* 122: 373-378.
- Kranenburg AR, Willems-Widyastuti A, Moori WJ, Sterk PJ, Alagappan VK, de Boer WI, Sharma HS (2006) Enhanced bronchial expression of extracellular matrix proteins in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Pathol* 126: 725-35.
- Kreis T & Vale R (1993) Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins. A Sambrook & Tooze publication at Oxford University Press.
- Krupsky M, Fine A, Berk JL, Goldstein RH (1994) Retinoic acid-induced inhibition of type I collagen gene expression by human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1219: 335-341.
- Kvansakul M, Hopf M, Ries A, Timpl R, Hohenester E (2001) Structural basis for the high-affinity interaction of nidogen-1 with immunoglobulin-like domain 3 of perlecan. *EMBO J* 20: 5342-5346.
- Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L (1990) Extracellular matrix. *FEBS Lett* 268: 386-393.
- Lackey DE, Ashley SL, Davis AL, Hoag KA (2008) Retinoic acid decreases adherence of murine myeloid dendritic cells and increases production of matrix metalloproteinase-9. *J Nutr* 138: 1512-9.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lancillotti F, Darwiche N, Celli G, De Luca LM (1992). Retinoid status and the control of keratin expression and adhesion during the histogenesis of squamous metaplasia of tracheal epithelium. *Cancer Res* 52: 6144-6152.
- Lang MR, Fiaux GW, Gillooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D (1994) Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and nonemphysematous lungs. *Thorax* 49: 319-326.
- Langeveld JP, Wieslander J, Timoneda J, McKinney P, Butkowski RJ, Wisdom BJ Jr, Hudson BG (1988) Structural heterogeneity of the noncollagenous domain of basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263: 10481-10488.
- Law L, Zheng L, Orsida B, Levvey B, Oto T, Kotsimbos AT, Snell GI, Williams TJ (2005) Early changes in basement membrane thickness in airway walls post-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 24: 1571-6.
- Lea RG, Riley SC, Antipatis C, Hannah L, Ashworth CJ, Clark DA, Critchley HO (1999) Cytokines and the regulation of apoptosis in reproductive tissues: a review. *Am J Reprod Immunol* 42: 100-109.
- LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R (2007) Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med* (Maywood) 232: 1121-9.
- Leinonen A, Mariyama M, Mochizuki T, Tryggvason K, Reeders ST (1994) Complete primary structure of the human type IV collagen alpha 4(IV) chain. Comparison with structure and expression of the other alpha (IV) chains. *J Biol Chem* 269: 26172-26177.
- Lerner RA, Glasscock KJ, Dixon FJ (1967) The role of antiglomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J Exp Med* 126: 989-1004.
- Li C & Gudas LJ (1996) Murine laminin B1 gene regulation during the retinoic acid- and dibutyryl cyclic AMP-induced differentiation of embryonic F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 271: 6810-6818.
- Li S, Edgar D, Fässler R, Wadsworth W, Yurchenco PD (2003) The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell* 4: 613-24.
- Li S, Liquari P, McKee KK, Harrison D, Patel R, Lee S, Yurchenco PD (2005) Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *J Cell Biol* 169: 179-89.
- Lieber CS (2000) Alcohol: its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nutr* 20: 395-430.

- Lietz G, Henry CJ, Mulokozi G, Mugyabuso JK, Ballart A, Ndossi GD, Lorri W, Tomkins A (2001) Comparison of the effects of supplemental red palm oil and sunflower oil on maternal vitamin A status. *Am J Clin Nutr* 74: 501-509.
- Lindblom A & Paulsson M (1996) "Extracellular Matrix", vol.1, ed. Wayne D. Comper. Overseas Publisher Association, Amsterdam.
- Lippman SM & Lotan R (2000) Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents. *J Nutr* 130: 479S-482S.
- Livrea MA & Tesoriere L (1998) Antioxidant activity of vitamin A within lipid environments. En *Subcellular Biochemistry* (Quinn and Kagan, eds.), pp 113-143. Plenum Press, New York.
- Maden M, Gale E, Zile M (1998) The role of vitamin A in the development of the central nervous system. *J Nutr* 128: 471S-475S.
- Maden M & Hind M (2004) Retinoic acid in alveolar development, maintenance and regeneration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 799-808.
- Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JA, Ericksen MB, Hopfer H, Xiao Y, Stillman IE, Kalluri R (2000) Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem* 275: 21340-8.
- Magro CM, Calomeni EP, Nadasdy T, Shusterman BD, Pope-Harman AL, Ross P Jr (2005) Ultrastructure as a diagnostic adjunct in the evaluation of lung allograft biopsies. *Ultrastructural pathology* 29: 95-106.
- Magro CM, Marsh CB, Allen JN, Ross P, Liff D, Knight DA, Waldman WJ, Nadasdy T, Cowden DJ (2007) The role of anti-endothelial cell antibody-mediated microvascular injury in the evolution of pulmonary fibrosis in the setting of collagen vascular disease. *Am J Clin Pathol* 127: 237-47.
- Magro CM, Waldman WJ, Knight DA, Allen JN, Nadasdy T, Frambach GE, Ross P, Marsh CB (2006) Idiopathic pulmonary fibrosis related to endothelial injury and antiendothelial cell antibodies. *Hum Immunol* 67: 284-97.
- Maina JN & West JB (2005) Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiol Rev* 85: 811-44.
- Mao JT, Tashkin DP, Belloni PN, Baileyhealy I, Baratelli F, Roth MD (2003) All-trans retinoic acid modulates the balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with emphysema. *Chest* 124: 1724-1732.

- Marín MP, Esteban-Pretel G, Alonso R, Sado Y, Barber T, Renau-Piqueras J, Timoneda J (2005) Vitamin A deficiency alters the structure and collagen IV composition of rat renal basement membranes. *J Nutr* 135: 695-701.
- Mariyama M, Leinonen A, Mochizuki T, Tryggvason K, Reeders ST (1994) Complete primary structure of the human alpha 3(IV) collagen chain. Coexpression of the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen chains in human tissues. *J Biol Chem* 269: 23013-23017.
- Marneros AG & Olsen BR (2001) The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol* 20: 337-345.
- Martin G, Poirier H, Hennuyer N, Crombie D, Fruchart JC, Heynan RA, Besbnard P, Auwerx J (2000) Induction of the fatty acid transport protein 1 and acylCoa synthase genes by dimmer-selective rexinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is the molecular target. *J Biol Chem* 275: 12612-12618.
- Martinez-Herandez A & Amenta PS (1983) The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 48: 656-677.
- Massaro D & Massaro GD (2002) Invited Review: pulmonary alveoli: formation, the "call for oxygen," and other regulators. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L345-58.
- Massaro GD & Massaro D (1996) Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Biol* 270: L305-L310.
- Massaro GD & Massaro D (1997) Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med* 3: 675-677.
- Massaro GD & Massaro D (2000) Retinoic acid treatment partially rescues failed septation in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L955-60.
- Massaro GD, Massaro D, Chan WY, Clerch LB, Ghyselinck N, Chambon P, Chandraratna RAS (2000) Retinoic acid receptor- $\beta$ : an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. *Physiol Genomics* 4: 51-57.
- Masure S, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G (1991) Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur J Biochem* 198: 391-398.

- Mayer U, Nischt R, Pöschl E, Mann K, Fukuda K, Gerl M, Yamada Y, Timpl R (1993) A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J* 12: 1879-1885.
- McDonnell S, Wright JH, Gaire M, Matrisian LM (1994) Expression and regulation of stromelysin and matrilysin by growth factors and oncogenes. *Biochem Soc Trans* 22: 58-63.
- McGowan SE (2007) Vitamin A deficiency increases airway resistance following C-fiber stimulation. *Respiratory physiology & neurobiology* 157: 281-9.
- McGowan SE & Holmes AJ (2007) Vitamin A deficiency alters pulmonary parenchymal collagen and tissue mechanics. *Respiratory physiology & neurobiology* 156: 312-9.
- McGowan SE, Holmes AJ, Smith J (2004) Retinoic acid reverses the airway hyperresponsiveness but not the parenchymal defect that is associated with vitamin A deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L437-L444.
- McGowan SE, Smith J, Holmes AJ, Smith LA, Businga TR, Madsen MT, Kopp UC, Kline JN (2002) Vitamin A deficiency promotes bronchial hyperreactivity in rats by altering muscarinic M(2) receptor function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L1031-9.
- McGowan SE, Takle EJ, Holmes AJ (2005) Vitamin A deficiency alters the pulmonary parenchymal elastic modulus and elastic fiber concentration in rats. *Respir Res* 6: 77.
- McMenamy KR & Zachman RD (1993) Effect of gestational age and retinol (vitamin A) deficiency on fetal rat lung nuclear retinoic acid receptors. *Pediatr Res* 33: 251-5.
- Means AL & Gudas LJ (1995) The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu Rev Nutr* 64: 201-233.
- Meban C (1980) Thickness of the air-blood barriers in vertebrate lungs. *J Anat* 131: 299-307.
- Megías L & Renau J (1998) Técnicas generales en “Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T) Aplicaciones biológicas”, editores: Renau-Piqueras J y Megías L.
- Miner JH & Li C (2000) Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev Biol* 217: 278-89.

- Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE (2004) Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131: 2247-56.
- Miner JH & Sanes JR (1994) Collagen IV  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , and  $\alpha 5$  chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J Cell Biol* 127: 679-891.
- Miner JH & Sanes JR (1996) Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *J Cell Biol* 135: 1403-13.
- Miner JH & Patton BL (1999) Laminin-11. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 811-6.
- Miner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins NA, Copeland NG, Sanes JR (1997) The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J Cell Biol* 137: 685-701.
- Miner JH & Yurchenco PD (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 255-84.
- Minette P, Buyschaert M, Rahier J, Veriter C, Frans A (1999) Pulmonary gas exchange in life-long nonsmoking patients with diabetes mellitus. *Respiration* 66: 20-4.
- Moldawer LL & Copeland EM (1997) Proinflammatory cytokines, nutritional support, and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. *Cancer* 79: 1828-1839.
- Molet S, Belleguic C, Lena H, Germain N, Bertrand CP, Shapiro SD, Planquois JM, Delaval P, Lagente V (2005) Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation Res* 54: 31-36.
- Montes GS (1996) Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 20: 15-27.
- Montes GS, Krisztán RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourão PA, Junqueira LC (1980) Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry* 65: 131-41.
- Morabia A, Sorenson A, Kumanyika SK, Abbey H, Cohen BH, Chee E (1989) Vitamin A, cigarette smoking, and airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* 140: 1312-6.
- Morath C, Dechow C, Lehrke I, Haxsen V, Waldherr R, Floege J, Ritz E, Wagner J (2001) Effects of retinoids on the TGF-beta system and extracellular matrix in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 12: 2300-9.

- Morrison KE, Mariyama M, Yang-Feng TL, Reeders ST (1991) Sequence and localization of a partial cDNA encoding the human alpha 3 chain of type IV collagen. *Am J Hum Genet* 49: 545-554.
- Morrissey JH (1981) Silver stain proteins in polyacrilamide gels. A modified procedure with enhance uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117: 307-310.
- Mupanemunda RH, Lee DSC, Fraher LJ, Koura IR, Chance GW (1994) Postnatal changes in serum retinol status in very low birth weight infants. *Early Hum Dev* 38: 45-54.
- Murata M & Kawanishi S (2000) Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem* 275: 2003-8.
- Myers JC, Dion AS, Abraham V, Amenta PS (1996) Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell Tissue Res* 286: 493-505.
- Myhre AM, Takahashi N, Blomhoff R, Breitman TR, Norum KR (1996) Retinoylation of proteins in rat liver, kidney, and lung in vivo. *J Lipid Res* 37: 1971-1977.
- Myllyharju J & Kivirikko KI (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20: 33-43.
- Nakano KY, Iyama KI, Mori T, Yoshioka M, Hiraoka T, Sado Y, Ninomiya Y (2001) Loss of alveolar basement membrane type IV collagen alpha3, alpha4, and alpha5 chains in bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *J Pathol* 194: 420-7.
- National Research Council (1978) Nutrient requirements of Laboratory animals, 3 ed. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- National Research Council (1995) Nutrient requirements of Laboratory animals, 4 ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22.
- Nguyen NM, Bai Y, Mochitate K, Senior RM (2002a) Laminin alpha-chain expression and basement membrane formation by MLE-15 respiratory epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L1004-11.
- Nguyen NM, Miner Jh, Pierce RA, Senior RM (2002b) Laminin alpha 5 is required for lobar septation and visceral pleural basement membrane formation in the developing mouse lung. *Dev Biol* 246: 231-44.
- Nguyen NM & Senior RM (2006) Laminin isoforms and lung development: all isoforms are not equal. *Dev Biol* 294: 271-9.

- Noy N (2000) Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 348: 481-495.
- Ogata Y, Itoh Y, Nagase H (1995) Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *J Biol Chem* 270: 18506-11.
- Olsen BR (1999) Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol* 147: 909-912.
- Oohashi T, Sugimoto M, Mattei MG, Ninomiya Y (1994) Identification of a new collagen IV chain, alpha 6(IV), by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5. *J Biol Chem* 269: 7520-7526.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285.
- Overall CM, Wrana JL, Sodek J (1989) Transforming growth factor-beta regulation of collagenase, 72 kDa-progelatinase, TIMP and PAI-1 expression in rat bone cell populations and human fibroblasts. *Connect Tissue Res* 20: 289-294.
- Ozşahin K, Tuğrul A, Mert S, Yüksel M, Tuğrul G (2006) Evaluation of pulmonary alveolo-capillary permeability in Type 2 diabetes mellitus: using technetium 99mTc-DTPA aerosol scintigraphy and carbon monoxide diffusion capacity. *J Diabetes Complicat* 20: 205-9.
- Palace VO, Khaper N, Quin Q, Singal PK (1999) Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 26: 746-761.
- Palozza P, Luberto C, Calviello G, Ricci P, Bartoli GM (1997) Antioxidant and prooxidant role of  $\beta$ -carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure. *Free Radic Biol Med* 22: 1065-73.
- Pan TC, Sasaki T, Zhang RZ, Fassler R, Timpl R, Chu ML (1993) Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium binding. *J Cell Biol* 123: 1269-1277.
- Paquette NC, Zhang LY, Ellis WA, Scott AL, Kleeberger SR. (1996). Vitamin A deficiency enhances ozone-induced lung injury. *Am J Physiol* 270: L475-82.
- Pasatiempo AM, Taylor CE, Ross AC (1991) Vitamin A status and the immune response to pneumococcal polysaccharide: effects of age and early stages of retinol deficiency in rats. *J Nutr* 121: 556-562.

- Pasquali MAB, Gelain DP, Zanotto-Filho A, de Souza LF, de Oliveira RB, Klamt F, Moreira JCF (2008) Retinol and retinoic acid modulate catalase activity in Sertoli cells by distinct and gene expression-independent mechanisms. *Toxicol in Vitro* 22: 1177-83.
- Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I (2002) Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* 12: 197-207.
- Patton BL, Connoll AM, Martin PT, Cunningham JM, Mehta S, Pestronk A, Miner JH, Sanes JR (1999) Distribution of ten laminin chains in dystrophic and regenerating muscles. *Neuromuscul Disord* 9: 423-33.
- Paulsson M (1992) Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 93-127.
- Pendaries V, Verrecchia F, Michel S, Mauviel A (2003) Retinoic acid receptors interfere with the TGF-beta/Smad signaling pathway in a ligand-specific manner. *Oncogene* 22: 8212-20.
- Perry J, Zheng TK, Sado Y, Dobson H, Jefferson B, Jacobs R, Thorner PS (2006) Type IV collagen induces podocytic features in bone marrow stromal stem cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 17: 66-76.
- Peters DK, Rees AJ, Lockwood CM, Pusey CD (1982) Treatment and prognosis in antibasement membrane antibody-mediated nephritis. *Transplant Proc* 14: 513-521.
- Pierce RA, Griffin GL, Miner JH, Senior RM (2000) Expression patterns of laminin  $\alpha 1$  and  $\alpha 5$  in human lung during development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 742-747.
- Pihlajaniemi T & Rehn M (1995) Two new collagen subgroups: membrane-associated collagens and types XV and XVII. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 50: 225-62.
- Pitt GAJ (1981) The assesment of vitamin A status. *Proc Nutr Soc* 40: 173-178.
- Podda M, Weber C, Traber MG, Milbradt R, Packer L (1999) Sensitive high-performance liquid chromatography techniques for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols, ubiquinol and ubiquinones in biological samples. *Methods Enzymol* 299: 330-341.
- Pollner R, Schmidt C, Fisher G, Kühn K, Pöschl E (1997) Cooperative and competitive interaction of regulatory elements are involved in the control of divergent transcription of human COL4A1 and COL4A2 genes. *FEBS Lett* 405: 31-36.

- Postma DS & Timens W (2006) Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3: 434-9.
- Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Ninomiya Y, Mayer U (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131: 1619-28.
- Prockop DJ & Kivirikko KI (1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64: 403-434.
- Radomska-Pandya A, Chen GP, Czernik PJ, Little JM, Samokyszyn VM, Carter CA, Nowak Gd (2000) Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC): implications for PKC signaling and cancer therapy. *J Biol Chem* 275: 22324-22330.
- Redington AE (2000) Fibrosis and airway remodeling. *Clin Exp Allergy* 30: Suppl 1 42-45.
- Rees AJ (1984) Pulmonary injury caused by anti-basement membrane antibodies. *Semin Resp Med* 5: 264-272.
- Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A Diet. *J Nutr* 127: 838S-841S.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1953.
- Reifen R, Nur T, Ghebermeskel K, Zaiger G, Urizky R, Pines M (2002) Vitamin A deficiency exacerbates inflammation in a rat model of colitis through activation of nuclear factor- $\kappa$ B and collagen formation. *J Nutr* 132: 2743-2747.
- Reinhardt D, Mann, K, Nischt R, Fox JW, Chu ML, Krieg T, Timpl R (1993) Mapping of nidogen binding sites for collagen type IV, heparan sulfate proteoglycan, and zinc. *J Biol Chem* 268: 10881-10887.
- Renau-Piqueras J, Zaragoza R, De Paz P, Báguena-Cervellera R, Megías L, Guerri C (1989) Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediated filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative fluorescence and immunogold electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 37: 229-240.
- Renaud JP & Moras D (2000) Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci* 57: 1748-69.

- Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh S, Lee HB (2005) Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 16: 667-75.
- Rial E, González-Barroso M, Fleury C, Iturrizaga S, Sanchis D, Jiménez-Jiménez, Ricquier D, Goubern M, Bouillaud F (1999) Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *EMBO J* 18: 5827-5833.
- Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD (1995) The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med* 46: 443-53.
- Ricquier D & Bouillaud F (2000) Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 529: 3-10.
- Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST (1989) Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1: 520-524.
- Rohrbach DH, Robinson LK, Murrah VA (1993) Loss of the basement membrane matrix molecule, bamin, in diphenylamine-treated mice. *Matrix* 13: 341-350.
- Rosales FJ & Ross AC (1998) Acute inflammation induces hyporetinemia and modifies the plasma and tissue response to vitamin A supplementation in marginally vitamin A-deficient rats. *J Nutr* 128: 960-6.
- Ross AC (1992) Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. *Proc Soc Exp Biol Med* 200: 303-320.
- Ross AC (2005) Vitamini A physiology. 329-39. From Encyclopedia of human nutrition.
- Ross AC & Stephensen CB (1996) Vitamin A and retinoids in antiviral responses. *FASEB J* 10: 979-985.
- Ross AC, Zolfaghari R, Weisz J (2001) Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr Opin Gastroenterol* 17: 184-192.
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80: 1021-1054.
- Royce LS, Kibbey MC, Mertz P, Kleinman HK, Baum BJ (1993) Human neoplastic submandibular intercalated duct cells express an acinar phenotype when cultured on a basement membrane matrix. *Differentiation* 52: 247-255.
- Ruben GC & Yurchenco PD (1994) High resolution platinum-carbon replication of freeze-dried basement membrane. *Microsc Res Tech* 28: 13-28.

- Sado Y, Kagawa M, Kishiro Y, Sugihara K, Naito I, Seyer JM, Sugimoto M, Oohashi T, Ninomiya Y (1995) Establishment by the rat lymph node method of epitope-defined monoclonal antibodies recognizing the six different alpha chains of human type IV collagen. *Histochem Cell Biol* 104: 267-75.
- Sado Y, Kagawa M, Naito I, Ueki Y, Seki T, Momota R, Oohashi T, Ninomiya Y (1998) Organization and expression of basement membrane collagen IV genes and their roles in human disorders. *J Biochem* 123: 767-776.
- Sagel SD, Kapsner RK, Osberg I (2005) Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 39: 224-32.
- Sales VL, Engelmayr GC Jr, Mettler BA, Johnson JA Jr, Sacks MS, Mayer JE Jr (2006) Transforming growth factor-beta1 modulates extracellular matrix production, proliferation, and apoptosis of endothelial progenitor cells in tissue-engineering scaffolds. *Circulation* 114: I193-9.
- Sasaki T, Fässler R, Hohenester E (2004) Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* 164: 959-63.
- Sasaki T, Fukai N, Mann K, Göhring W, Olsen BR, Timpl R (1998) Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 17: 4249-56.
- Sato H & Seiki M (1993) Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8: 395-405.
- Sato T, Kato R, Tyson CA (1995) Regulation of differentiated phenotype of rat hepatic lipocytes by retinoids in primary culture. *Exp Cell Res* 217: 72-83.
- Saus J, Wieslander J, Langeveld JP, Quinones S, Hudson BG (1988) Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem* 263: 13374-13380.
- Sawhney RS, Wood LS, Vogeli G (1997) Molecular cloning of the bovine alpha 1(IV) procollagen gene (col4A1) and its use in investigating the regulation of expression of type IV procollagen by retinoic acid in bovine lens epithelial cells. *Cell Biol Int* 21: 501-510.
- Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J (1995) Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med* 238: 143-152.

- Schittny JC & Yurchenco PD (1989) Basement membranes: molecular organization and function in development and disease. *Curr Opin Cell Biol* 1: 983-988.
- Schuger L, O'Shea S, Rheinheimer J, Varani J (1990) Laminin in lung development: effects of anti-laminin antibody in murine lung morphogenesis. *Dev Biol* 137: 26-32.
- Semba RD (1994) Vitamin A, immunity and infection. *Clin Infect Dis* 19: 489-499.
- Semba RD (1999) Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoan infections. *Proc Nutr Soc* 58: 719-727.
- Semba RD & Tang AM (1999) Micronutrients and the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Br J Nutr* 81: 181-189.
- Shahana S, Björnsson E, Lúdvíksdóttir D, Janson C, Nettelbladt O, Venge P, Roomans GM, BHR-group (2005) Ultrastructure of bronchial biopsies from patients with allergic and non-allergic asthma. *Respir Med* 99: 429-43.
- Shapiro SD, Campbell EJ, Welgus HG, Senior RM (1991) Elastin degradation by mononuclear phagocytes. *Ann NY Acad Sci* 624: 69-80.
- Shenai JP, Chytil F, Jhaveri A, Stahlman MT (1981) Plasma vitamin A and retinol-binding protein in premature and term neonates. *J Pediatr* 99: 302-305.
- Shenai JP, Kennedy KA, Chytil F, Stahlman MT (1987) Clinical trial of vitamin A supplementation in infants susceptible to bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 111: 269-277.
- Shimada J, Suzuki Y, Kim SJ, Wang PC, Matsumura M, Kojima S (2001) Transactivation via RAR/RXR-Sp1 interaction: characterization of binding between Sp1 and GC box motif. *Mol Endocrinol* 15: 1677-1692.
- Siebold B, Deutzmann R, Kuhn K (1988) The arrangement of intra- and intermolecular disulfide bonds in the carboxyterminal, non-collagenous aggregation and cross-linking domain of basement-membrane type IV collagen. *Eur J Biochem* 176: 617-624.
- Siems W, Sommerburg O, Schild L, Augustin W, Langhans C-D, Wiswedel I (2002)  $\beta$ - carotene cleavage products induce oxidative stress in vitro by impairing mitochondrial respiration. *FASEB J* 16: 1289-91.
- Sirianni FE, Milaninezhad A, Chu FS, Walker DC (2006) Alteration of fibroblast architecture and loss of Basal lamina apertures in human emphysematous lung. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 632-8.

- Smirnov SP, McDearmon EL, Li S, Ervasti JM, Tryggvason K, Yurchenco PD (2002) Contributions of the LG modules and furin processing to laminin-2 functions. *J Biol Chem* 277: 18928-18937.
- Smith PG, Fan Q, Zhang R (1999) Divergence of smooth muscle target and sympathetic pathway cell phenotypes in the orbit of the developing rat. *J Comp Neurol* 408: 352-64.
- Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D (1999) Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* 144: 151-60.
- Sommer A (1995) Vitamin A deficiency and its consequences: a field guide to detection and control. World Health Organisation. Geneva, Switzerland.
- Sommer A, Katz J, Tarwotjo I (2001) Increased risk of respiratory disease and diarrhea in children with preexisting mild vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr* 40: 1090-1095.
- Sporn MB, Roberts AB, Goodman D. (1984) Introduction. Nomenclature of retinoids. En *The Retinoids* (Sporn, M.B., Roberts, A. & Goodman, D.S. eds.) vol. 1: 2-5. Academic Press, New York.
- Starcher BC (2000) Lung elastin and matrix. *Chest* 117: 229S-34S.
- Stanton MC & Tange JD (1958) Goodpasture's syndrome (pulmonary haemorrhage associated with glomerulonephritis). *Austr Ann Med* 7: 132-144.
- Stephensen CB (2001) Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr* 21: 167-92.
- Sternlicht MD & Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516.
- Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA (1989) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 264: 17374-17378.
- Stirling RG & Chung KF (2001) Severe asthma: definition and mechanisms. *Allergy* 56: 825-840.
- Stracher B & Williams I (1989) The beige mouse: role of neutrophil elastase in the development of pulmonary emphysema. *Exp Lung Res* 15: 785-800.

- Striker LJ, Killen PD, Chi E, Striker GE (1984) The composition of glomerulosclerosis I. Studies in focal sclerosis, crescentic glomerulonephritis and membranoproliferative glomerulonephritis. *Lab Invest* 5:181-192.
- Sugimoto T, Deji N, Kume S, Osawa N, Sakaguchi M, Isshiki K, Koya D, Kashiwagi A (2007) Pulmonary-renal syndrome, diffuse pulmonary hemorrhage and glomerulonephritis, associated with Wegener's granulomatosis effectively treated with early plasma exchange therapy. *Intern Med* 46: 49-53.
- Sundaramoorthy M, Meiyappan M, Todd P, Hudson BG (2002) Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. *J Biol Chem* 277: 31142-53.
- Swartz-Basile DA, Wang L, Tang Y, Pitt HA, Rubin DC, Levin MS (2003) Vitamin A deficiency inhibits intestinal adaptation by modulating apoptosis, proliferation, and enterocyte migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G424-32.
- Taghavi S, Krenn K, Jaksch P, Klepetko W, Aharinejad S (2005) Broncho-alveolar lavage matrix metalloproteases as a sensitive measure of bronchiolitis obliterans. *Am J Transplant* 5: 1548-52.
- Takagi J, Yang Y, Liu JH, Wang JH, Springer TA (2003) Complex between nidogen and laminin fragments reveals a paradigmatic beta propeller interface. *Nature* 424: 969-974.
- Takahashi Y, Miura T, Takahashi K (1993). Vitamin A is involved in maintenance of epithelial cells on the bronchioles and cells in the alveoli of rats. *J Nutr* 123: 634-641.
- Takkunen M, Ainola M, Vainionpää N, Grenman R, Patarroyo M, García de Herreros A, Konttinen YT, Virtanen I (2008) Epithelial-mesenchymal transition downregulates laminin alpha5 chain and upregulates laminin alpha4 chain in oral squamous carcinoma cells. *Histochem Cell Biol* 130; 509-25.
- Taub M (1991) Retinoic acid inhibits basement membrane protein biosynthesis while stimulating dome formation by Madin Darby canine kidney cells in hormonally defined serum-free medium. *J Cell Physiol* 148: 211-219.
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981) Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26: 99-105.
- Tesoriere L, Ciaccio M, Bongiorno A, Riccio A, Pintaudi AM, Livrea MA (1993) Antioxidant activity of all-trans-retinol in homogeneous solution and in phosphatidylcholine liposomes. *Arch Biochem Biophys* 307: 217-223.

- Tiger CF, Champlaud MF, Pedrosa-Domellof F, Thornell LE, Ekblom P, Gullberg D (1997) Presence of laminin alpha5 chain and lack of laminin alpha1 chain during human muscle development and in muscular dystrophies. *J Biol Chem* 272: 28590-5.
- Timoneda J, Gunwar S, Monfort G, Saus J, Noelken ME, Hudson BG (1990) Unusual dissociative behavior of the noncollagenous domain (hexamer) of basement membrane collagen during electrophoresis and chromatofocusing. *Connect Tissue Res* 24: 169-86.
- Timpl R (1986) Recent advances in the biochemistry of glomerular basement membrane. *Kidney Int* 30: 293-298.
- Timpl R (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 180: 487-502.
- Timpl R & Brown JC (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18: 123-132.
- Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR (1979) Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254: 9933-9937.
- Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kuhn K (1981) A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem* 120: 203-211.
- Toi M, Ishigaki S, Tominaga T (1998) Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Res Treat* 52: 113-24.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350.
- Twining SS, Schulte DP, Zhou X, Wilson PM, Fish BL, Moulder JE (1997) Changes in rat corneal matrix metalloproteinases and serine proteinases under vitamin A deficiency. *Curr Eye Res* 16: 158-165.
- Tzu J & Marinkovich MP (2008) Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 199-214.
- Underwood BA (2004) Vitamin A deficiency disorders: international efforts to control a preventable “pox”. *J Nutr* 134: 231S-236S.
- Underwood BA & Arthur P (1996) The contribution of vitamin A to public health. *EASEB J* 10: 1040-1048.

- Ushiki T (2002) Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol* 65: 109-26.
- Utani A, Kopp JB, Kozak CA, Matsuki Y, Amizuka N, Sugiyama S, Yamada Y (1995) Mouse kalinin B1 (laminin beta 3 chain): cloning and tissue distribution. *Lab Invest* 72: 300-310.
- Vahlquist A (1999) What are natural retinoids? *Dermatology* 199: 3-11.
- Van Ranst M, Norga K, Masure S, Proost P, Vandekerckhove F, Auwerx J, Van Damme J, Opdenakker G (1991) The cytokine-protease connection: identification of a 96-kD THP-1 gelatinase and regulation by interleukin-1 and cytokine inducers. *Cytokine* 3: 231-239.
- Van Vliet A, Van Alderwegen IE, Baelde HJ, De Heer E, Killen PD, Kalluri RK, Bruijn JA, Bergijk EC (1999) Differential expression of collagen type IV alpha-chains in the tubulointerstitial compartment in experimental chronic serum sickness nephritis. *J Pathol* 189: 279-287.
- Vasios GW, Gold JD, Petkovich M, Chambon P, Gudas LJ (1989) A retinoic acid-responsive element is present in the 5' flanking region of the laminin B1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9099-9103.
- Veness-Meehan KA, Bottone F, Stiles A (2000) Effects of retinoic acid on airspace development and lung collagen in hyperoxia-exposed newborn rats. *Pediatr Res* 48: 434-444.
- Veness-Mehan KA, Pierce RA, Moats-Staats BM, Stiles AD (2002) Retinoic acid attenuates O<sub>2</sub>-induced inhibition of lung septation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L971-L980.
- Vignola AM, Kips J, Bousquet J (2000) Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105: 1041-1053.
- Vlahovic G, Russell ML, Mercer RR, Crapo JD (1999) Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 2086-2092.
- Vracko R (1972) Significance of basal lamina for regeneration of injured lung. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 355: 264-274.
- Vracko R (1974) Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am J Pathol* 77: 314-346.
- Vracko R & Benditt EP (1970) Capillary basal lamina thickening. Its relationship to endothelial cell death and replacement. *J Cell Biol* 47: 281-285.

- Vracko R & Benditt EP (1972) Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement. Observations on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries. *J Cell Biol* 55: 406-419.
- Vracko R & Strandness DE Jr (1967) Basal lamina of abdominal skeletal muscle capillaries in diabetics and nondiabetics. *Circulation* 35: 690-700.
- Vuorio E & de Crombrughe B (1990) The family of collagen genes. *Annu Rev Biochem* 59: 837-872.
- Wang L, Tankersley LR, Tang M, Potter JJ, Mezey E (2002) Regulation of the murine  $\alpha 2(I)$  collagen promoter by retinoic acid and retinoid X receptors. *Arch Biochem Biophys* 401: 262-270.
- Wang L, Tankersley LR, Tang M, Potter JJ, Mezey E (2004) Regulation of alpha 2(I) collagen expression in stellate cells by retinoic acid and retinoid X receptors through interactions with their cofactors. *Arch Biochem Biophys* 428: 92-8.
- Wang SY & Gudas LJ (1988) Protein synthesis inhibitors prevent the induction of laminin B1, collagen IV (alpha 1), and other differentiation-specific mRNAs by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Physiol* 136: 305-11.
- Wang SY, LaRosa GJ, Gudas LJ (1985) Molecular cloning of gene sequences transcriptionally regulated by retinoic acid and dibutyryl cyclic AMP in cultured mouse teratocarcinoma cells. *Dev Biol* 107: 75-86.
- Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell M (1999) Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 91: 60-6.
- Watanabe K, Senju S, Toyoshima H, Yoshida M (1997) Thickness of the basement membrane of bronchial epithelial cells in lung diseases as determined by transbronchial biopsy. *Respir Med* 91: 406-10.
- Wenzel SE, Balzar S, Cundall M, Chu HW (2003) Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9. Association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J Allergy Clin Immunol* 111: 1345-1352.
- West KP Jr (2003) Vitamin A deficiency disorders in children and women. *Food Nutr Bull* 24: S78-S90.
- West KP, Howard GR, Sommer A (1989) Vitamin A and infection: public health implications. *Annu Rev Nutr* 9: 63-86.

- Weynand B, Jonckheere A, Frans A y Rahier J (1999) Diabetes mellitus induces a thickening of the pulmonary basement lamina. *Respiration* 66: 14-19.
- World Health Organisation (1998) Vitamin A deficiency. WHO <http://www.who.int/vaccines-diseases/diseases/vitamin-a.htm>.
- Wieslander J, Barr JF, Butkowski RJ, Edwards SJ, Bygren P, Heinegard D, Hudson BG (1984) Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3838-3842.
- Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264: 17213-17221.
- Willem M, Miosge N, Halfter W, Smyth N, Jannetti I, Burghart E, Timpl R, Mayer U (2002) Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin  $\gamma$ 1 chain interferes with kidney and lung development. *Development* 129: 2711-2722.
- Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z (2005) Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- $\alpha$  1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166: 1321-1332.
- Wollemberger A, Ristau O, Sohoffa G (1960) Eine einfache technik der extrem schnellen abkuhlung groberer. *Pflujers Arch* 270: 399-412.
- Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach ChN Jr, Sunderman W Jr (1987) Lipoperoxides in Plasma as Measured by Liquid-Chromatographic Separation of Malondialdehyde-Thiobarbituric Acid Adduct. *Clin Chem* 33: 214-220.
- Yang J & Liu Y (2001) Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159: 1465-475.
- Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL (2004) Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* 22: 521-538.
- Yurchenco PD, Cheng YS, Colognato H (1992) Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol* 117: 1119-1133.
- Yurchenco PD & Ruben GC (1987) Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol* 105: 2559-68.

- Yurchenco PD & Schittny JC (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 4: 1577-1590.
- Yurchenco PD & Wadsworth WG (2004) Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Curr Opin Cell Biol* 16: 572-579.
- Zachman RD (1995) Role of vitamin A in lung development. *J Nutr* 125: 1634S-1638S.
- Zaragozá R, Gimeno A, Miralles VJ, García-Trevijano ER, Carmena R, García C, Mata M, Puertes IR, Torres L, Viña JR (2007) Retinoids induce MMP-9 expression through RARalpha during mammary gland remodeling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1140-8.
- Zeisberg M, Maeshima Y, Mosterman B, Kalluri R (2002) Renal fibrosis. Extracellular matrix microenvironment regulates migratory behavior of activated tubular epithelial cells. *Am J Pathol* 160: 2001-2008.
- Zhang K & Kramer RH (1996) Laminin 5 deposition promotes keratinocyte motility. *Exp Cell Res* 227: 309-322.
- Zile MH (1998) Vitamin A and embryonic development: an overview. *J Nutr* 128: 455S-458S.
- Zile MH (2001) Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J Nutr* 131: 705-708.
- Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA (2002) Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6292-6297.

## **PUBLICACIONES**



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Nutritional Biochemistry xx (2009) xxx–xxx

**Journal of  
Nutritional  
Biochemistry**

## Vitamin A deficiency alters rat lung alveolar basement membrane Reversibility by retinoic acid<sup>☆</sup>

Guillermo Esteban-Pretel<sup>a</sup>, M. Pilar Marín<sup>b</sup>, Jaime Renau-Piqueras<sup>b</sup>,  
Teresa Barber<sup>a</sup>, Joaquín Timoneda<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup>Sección de Biología y Patología Celular, Centro de Investigación Hospital “La Fe”, Valencia, Spain

Received 18 September 2008; received in revised form 28 November 2008; accepted 4 December 2008

### Abstract

Vitamin A is essential for lung development and pulmonary cell differentiation and its deficiency results in alterations of lung structure and function. Basement membranes (BMs) are also involved in those processes, and retinoic acid, the main biologically active form of vitamin A, influences the expression of extracellular matrix macromolecules. Therefore, we have analyzed the ultrastructure and collagen content of lung alveolar BM in growing rats deficient in vitamin A and the recovering effect of all-*trans* retinoic acid. Male weanling pups were fed a retinol-adequate or -deficient diet until they were 60 days old. A group of vitamin A-deficient pups were recovered by daily intraperitoneal injections of all-*trans* retinoic acid for 10 days. Alveolar BM in vitamin A-deficient rats doubled its thickness and contained irregularly scattered collagen fibrils. Immunocytochemistry revealed that these fibrils were composed of collagen I. Total content of both collagen I protein and its mRNA was greater in vitamin-deficient lungs. In agreement with the greater size of the BM the amount of collagen IV was also increased. Proinflammatory cytokines, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , did not change, but myeloperoxidase and TGF- $\beta$ 1 were increased. Treatment of vitamin A-deficient rats with retinoic acid reversed all the alterations, but the BM thickness recovered only partially. Retinoic acid recovering activity occurred in the presence of increasing oxidative stress. In conclusion, vitamin A deficiency results in alterations of the structure and composition of the alveolar BM which are probably mediated by TGF- $\beta$ 1 and reverted by retinoic acid. These alterations could contribute to the impairment of lung function and predispose to pulmonary disease.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

**Keywords:** Vitamin A; Retinoic acid; Basement membrane; Collagen; Oxidative stress; TGF- $\beta$ 1

### 1. Introduction

Although a global progress in the control of vitamin A deficiency (VAD)-related disorders has been seen in the last decade, VAD is still an important public health problem particularly for children in developing countries. VAD, even the asymptomatic subclinical form, increases morbidity and mortality from several childhood infections such as measles and diarrhea and also increases the incidence and morbidity of respiratory tract illnesses [1].

Retinoids, active metabolites of vitamin A, are required for normal mammalian fetal development and are involved in lung and alveolar formation during the neonatal period. They are also required for maintenance of alveolar architecture after the alveoli have been formed [2,3]. In rats, pulmonary alveoli are formed during the early postnatal life and they continue to form until about age 6–7 weeks [3]. Postnatal retinoic acid treatment increases the number of alveoli in developing rat lung, attenuates glucocorticoid-induced inhibition of postnatal alveolarization [4], increases type I collagen content in airspace walls and improves survival of newborn rats exposed to hyperoxia [5]. Similarly, studies of adult rats with elastase-induced emphysema, and rat pups exposed to hyperoxia, have shown that retinoids promote post hoc improvements in alveolar septation and lung architecture [3,6]. In humans, administration of vitamin

<sup>☆</sup> This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 05/2534), Spain; Fondo Europeo de Desarrollo Regional, U. Europea; and Generalitat Valenciana (grant GV2004-B-172). Guillermo Esteban-Pretel was a recipient of a fellowship from Generalitat Valenciana.

\* Corresponding author. Tel.: +34 963543189; fax: +34 963544917.

E-mail address: joaquin.timoneda@uv.es (J. Timoneda).

A reduces the incidence of bronchopulmonary dysplasia in vitamin A-deficient premature infants [7]; laboratory evidence suggests it could have a protective effect on respiratory status in patients with cystic fibrosis [8], and its potential application in the prevention and treatment of emphysema, based on the results with animals, is an exciting area of research [9].

Basement membranes (BMs) are laminar structures of highly specialized extracellular matrix (ECM) which separate cells from adjacent connective tissue. In the lung, BMs are associated with the airway and alveolar epithelium, endothelium, bronchial and vascular smooth muscle cells, nerve cells and visceral pleura. In the alveoli, they are also part of the air–blood barrier and thence traversed during the gas-exchange process. Quantitatively, their main components are type IV collagens and laminins which provide a framework where other BM components and contacting cells bind. Besides their structural functions, BMs direct cell migration, influence cell metabolism and regulate cell differentiation, proliferation and apoptosis [10,11]. In accordance with their functions, alterations in their structure and/or composition are involved in a great variety of illnesses. Concretely, BM thickening with altered deposition of ECM proteins, appearing before detectable functional defects, is a key pathological feature in several lung and kidney diseases such as asthma and diabetes [12,13]. Accumulation of some ECM proteins such as collagen IV and laminin has also been described in chronic pulmonary obstructive disease and idiopathic pulmonary fibrosis. Deposition of these proteins inversely correlated with lung function suggesting its implication in lung deterioration [14].

It is known that retinoic acid modulates through specific nuclear receptors the expression of several ECM proteins both directly, acting on their gene promoters, and indirectly, modifying the expression of other profibrotic factors [15,16]. Consequently, a deficiency of vitamin A could induce changes in the composition and the structure of BMs resulting in alterations of organ function and protracted pathological consequences. In fact, VAD promotes bronchial hyperreactivity [17], leads to emphysematous lungs with areas of interstitial pneumonitis [9,18] and results in squamous cell metaplasia with a relative decrease in the proportion of mucous and ciliated cells in the tracheobronchial tree [1]. Moreover, surfactant synthesis and ornithine decarboxylase activity, the rate-limiting enzyme in the synthesis of polyamines, are significantly lower in type II pneumocytes isolated from VAD rats [18], indicating an impaired functional and proliferative capacity. These alterations in lung function and architecture are associated with changes in ECM protein content and distribution. It has been reported that lungs of VAD rats have less collagen in the adventitia of small arteries and arterioles and in the alveolar septa; however, its amount is increased especially in the areas of interstitial pneumonitis and remains normal in peribronchial ECM. The content of elastin is also lower in

the lung parenchyma as well as in the small arteries and arterioles of VAD rats [18,19]. Retinoic acid treatment of the VAD animals restores the collagen content and the mechanical properties of the lung but not the parenchymal defects such as the reduction in alveolar surface area. This correlation between collagen content and mechanical properties evidences the strong influence of the ECM on the lung function [9]. As BMs play an important role in pneumocyte differentiation [20], regulate gap junction formation and intercellular communication between alveolar epithelial cells [21], contain apoptotic and survival signals for endothelial cells [22] and form a continuous structure throughout the entire lung, they can be involved in the functional consequences of VAD. Therefore we have analyzed the ultrastructure and composition of ABM in the lung of VAD rats and the reversibility of the alterations by treatment with retinoic acid. Since VAD could induce an inflammatory process and be associated with oxidative stress [23,24], both processes resulting in increased BM protein expression [25], we have also measured proinflammatory cytokines, inflammatory cell infiltration markers and lipid peroxidation.

## 2. Methods and materials

### 2.1. Animal treatment

Vitamin A-deficient animals were prepared as previously described [26]. Briefly, pregnant Wistar female rats (Charles River, Barcelona, Spain) were randomly assigned either to a control or to a VAD group and housed in individual cages in a room maintained at 22–25°C with a 12-h light–dark cycle. The day after delivery, the dams of the control group were fed a complete solid diet (AIN-93, ICN Biomedicals, Cleveland, OH, USA). The dams of the VAD group were fed the same diet but devoid of vitamin A. After 21 days of lactation period, male pups of each group were weaned into their corresponding dam diet until they were 60 days old. The 60-day-old male rats of the VAD group were randomly subdivided into three groups: VAD group, sacrificed that same day together with the controls; retinoic acid recovered (RR) group, treated further with 10 daily intraperitoneal injections of 100 µg of all-*trans* retinoic acid in 100 µl of sunflower seed oil; and vehicle-treated group, injected as the RR group but with sunflower oil only. All groups were pair fed. Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg) before sacrifice. The protocol was approved by the Ethic Committee for Animal Research and Welfare at the University of Valencia.

### 2.2. Tissue sample preparation

Blood and lung samples for biochemical studies were processed as previously described [26] and stored frozen until they were used. For ultrastructural and immunocytochemical studies, whole anesthetized animals were perfused with 0.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4).

### 2.2.1. Samples for ultrastructural studies

Small fragments of rat lung were postfixed in 1.5% glutaraldehyde and 1% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 60 min at 4°C, dehydrated in graded concentrations of ethanol and embedded in Epon 812 (six blocks per sample) [26,27]. Ultrathin sections were examined on a Philips CM 100 Transmission Electron Microscope.

### 2.2.2. Samples for immunocytochemistry

Small fragments of rat lung, previously perfused, were postfixed with the same fixative solution for 120 min at 4°C, washed in the buffer, incubated for 50 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, dehydrated in methanol and embedded in Lowicryl K4M following the progressive lowering temperature procedure as previously described [27].

### 2.3. Determination of retinoids

Plasma retinol and lung retinoids were extracted as described [28], dissolved in methanol/ethanol (1:1, v/v) and measured by the isocratic HPLC method of Arnaud et al. [29]. A Nova-pak C-18 column (3.9×150 mm, Waters) and a mixture of acetonitrile/dichloromethane/methanol (70:20:10), as eluent, were used.

### 2.4. Determination of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and TGF- $\beta$ in lung

Pieces of frozen lung (0.1 g) were homogenized in 1 ml of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.1% Triton X-100 and 5  $\mu$ l of protease inhibitor cocktail (Sigma), sonicated twice for 30 s with cooling and centrifuged at 450,000 $\times$ g (Optima MAX ultracentrifuge, Beckman) for 10 min. The supernatants were analyzed for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$  contents by commercial ELISA kits (Biolink 2000, Promega in the case of TGF- $\beta$ ) as recommended by the manufacturer.

### 2.5. Determination of myeloperoxidase activity

Lung extracts obtained as described for cytokine determinations were assayed for myeloperoxidase activity by a described photometric method based on the oxidation of *o*-dianisidine [30], with some modifications. Ten microliters of extract, diluted 1/10 in 50 mM Na-citrate-phosphate buffer (pH 5.0), was added to 990  $\mu$ l of dilution buffer containing 0.1 mg/ml *o*-dianisidine (Sigma) and 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the absorbance change at 450 ( $\Delta A_{450}$ ) registered continuously over 3 min at room temperature. The assay was also performed in the presence of 40 mM NaN<sub>3</sub>. Myeloperoxidase activity was calculated from NaN<sub>3</sub>-inhibitable peroxidase activity and expressed in arbitrary units, where an arbitrary unit is defined as the amount of enzyme which produces a  $\Delta A_{450}$  of 0.001/min.

### 2.6. Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde (MDA) in the lung extracts obtained as described for cytokine determinations and by using HPLC for separating the MDA-thiobarbituric acid adducts as

reported [31]. Standards of MDA-bis (Merck) were used for determining MDA concentration.

### 2.7. Solubilization of collagen I and collagen IV

Lung pieces of 0.1 g were homogenized in 2 ml of Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) containing 0.25% Triton X-100 and 10  $\mu$ l protease inhibitor cocktail (Sigma). The suspension was centrifuged and the pellet digested extensively with 0.3 mg/ml of bacterial collagenase (high-purity collagenase, type VII, Sigma) at 37°C for 48 h in digestion buffer consisting of 50 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% NaN<sub>3</sub> and 5  $\mu$ l/ml of the protease inhibitor cocktail mentioned above. The suspension was centrifuged and EDTA, to a final concentration of 25 mM, was added to the supernatant. The solubilized material was stored at -80°C until used. Digestion of the pellet was repeated to confirm that no more collagen fragments were solubilized. A time course of the solubilization process was analyzed by Western blotting to detect the collagen fragments accumulating with the incubation time. Purified collagen (Sigma) was also digested with collagenase to confirm the accumulation of the quantified fragments.

### 2.8. Protein quantification by Western blotting

SDS-PAGE and immunoblotting were carried out as previously described [26]. Collagenase solubilized samples were separated in 6–20% acrylamide gradient gels in reduced conditions (collagen I) or in nonreducing conditions (collagen IV), and transferred electrophoretically to PVDF paper at 150 mA constant current for 18 h at 4°C. Specific rabbit polyclonal antibodies against collagen I (Calbiochem; diluted 1/1000) and collagen IV (Santa Cruz; diluted 1/100) were used for immunodetection. The polyclonal anti-collagen IV antibody reacted with the six  $\alpha$ (IV) chains. Anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase (Promega; diluted 1/7500) was used as the secondary antibody. After color development, blots were scanned with an HP scanjet 5400c, and protein bands were quantified using the Scion Image Programme. Linearity ranges were established by blotting different amounts of each sample. Control samples were included in each blot as reference for the relative quantification of the protein bands.

### 2.9. Total RNA extraction and quantitative polymerase chain reaction

The response to VAD and to retinoic acid was assessed by measuring the steady-state level of mRNA in lung tissue from control, VAD and RR rats as described [32]. Total RNA was isolated from lung samples using the guanidinium thiocyanate method. One microgram of RNA was reverse transcribed to cDNA using Ready-To-Go You Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech) using random primers. Primer sets from each candidate gene were designed by Primer3 software and synthesized by Sigma. These were COL1A1 sense: 5-ATGGTGCTCCTGGTATTGCTG-3,

antisense: 5-CTCCTTTGGCACCAGTGTCTC-3; COL1A2 sense: 5-GAAGATGGTCACCCTGGAAAAC-3, antisense: 5-CAGGCTGTCCTTCAATCCATC-3. Measurement of gene expression was performed using the AB 7900HT Fast Real-Time PCR System and SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Standard curves were generated for each gene to determine the PCR efficiency and quantification of the copies of each mRNA in the samples. Linear regression analysis of the standard curves documented in all cases an  $R^2$  value of 0.99. Normalization of samples was performed by the reference gene,  $\beta$ 2-microglobulin, whose expression did not change in our experimental situations. All PCR products were tested by agarose gel electrophoresis and by dissociation curves. Correct amplification was verified in all samples and in all reactions by dissociation curves.

### 2.10. Ultrastructural morphometric analysis

The thickness of the BM was determined in randomly selected micrographs. In each microphotograph, the thickness of the alveolar BM was measured at intervals of 1 cm with a minimum of 10 measurements per micrograph. The minimum sample size was determined by the progressive mean technique (confidence limit,  $\pm 5\%$ ) [26,27].

### 2.11. Ultrastructural immunolocalization of collagen I

Collagen I was located in the BM from the alveolar wall with the immunogold procedure as described [27]. Briefly, the ultrathin sections were initially incubated in 3%  $H_2O_2$  for 10 min. Then, after blocking and incubating with specific anti-collagen I primary antibody (Calbiochem) and gold-conjugated second antibody, the ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and examined in a Philips CM 100 Transmission Electron Microscope.

### 2.12. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Unless otherwise specified, histograms represent means (bars) $\pm$ S.D. (brackets);  $n=6$ , for the control group;  $n=7$  for the VAD group; and  $n=4$ , for the RR group. The data from the three groups were analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Differences were considered significant when the  $P$  value was  $<.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Retinoid status in plasma and lung

The determination of plasma retinol concentration has shown that our model of VAD induces a dramatic decrease in the levels of retinol in plasma and lung and of retinol palmitate in lung (Table 1). The retinol concentration in plasma from VAD rats decreased to less than 5% of the control group and did not increase with the retinoic acid treatment. Likewise, the amounts of retinol and retinol

Table 1

Concentrations of retinol and retinol palmitate in plasma and lungs of control, VAD and RR rats

	Control	VAD	RR
<i>Plasma (<math>\mu</math>M)</i>			
All-trans retinol	1.73 $\pm$ 0.01 (6)	0.07 $\pm$ 0.01 (7)*	0.05 $\pm$ 0.01 (4)*
All-trans retinol palmitate	ND	ND	ND
<i>Lung (nmol/g of tissue)</i>			
All-trans retinol	1.13 $\pm$ 0.01 (6)	0.03 $\pm$ 0.01 (7)*	0.05 $\pm$ 0.01 (4)*
All-trans retinol palmitate	2.87 $\pm$ 0.59 (6)	0.007 $\pm$ 0.003 (7)*	0.05 $\pm$ 0.04 (4)*

Values are expressed as mean $\pm$ S.D., with the number of animals indicated in parenthesis; \*significantly different from control group;  $P<.05$ .

palmitate per gram of tissue in VAD and RR lungs were reduced by more than 95%.

Unless specified, the results obtained with the vehicle-treated group did not significantly differ from the VAD group and for simplicity they will not be shown.

### 3.2. Effect of VAD and retinoic acid treatment on the ultrastructure of lung alveolar BM

Vitamin A deficiency induces alterations in the structure of alveolar BM which are improved by retinoic acid treatment. As shown in Fig. 1, electron microscopic examination revealed that the regular and uniform structure of alveolar BM in control animals (A, B) was enlarged and showed frequent inclusions of collagen fibril bundles in the VAD group (C, D). Splitting was also seen in some segments of the VAD BM, and the caveolar compartment in capillary endothelial and alveolar epithelial cells was apparently increased. However, definitive assessment and quantification of this increment need further work. After retinoic acid treatment, the BM reduced its size approaching that of the controls, and the collagen fibrils and BM splitting mostly disappeared (E, F).

In addition, the ultrastructural analysis showed a more abundant deposition of collagen fibrils in the interstitial ECM from the VAD compared to control or RR animals (data not shown).

A morphometric analysis was performed to compare the ABM size from the different groups. In order to better define the BM limits and to obtain more accurate values, the measurements were only done on the thin part of the alveolar walls where the alveolar epithelial BM and the endothelial capillary BM fuse. Fig. 2 summarizes the quantitative results concerning the BM thickness in control, VAD and RR animals. The ABM from VAD lungs (103 $\pm$ 17 nm) was about twofold that observed in controls (49 $\pm$ 6 nm), and treatment of VAD animals with retinoic acid reduced its size by 25% (76 $\pm$ 8 nm) but it did not reestablish the control value.

As we have mentioned above, the ABM in VAD lungs presented frequent and abundant fibrils of apparently collagenous material. Fig. 3A shows representative images

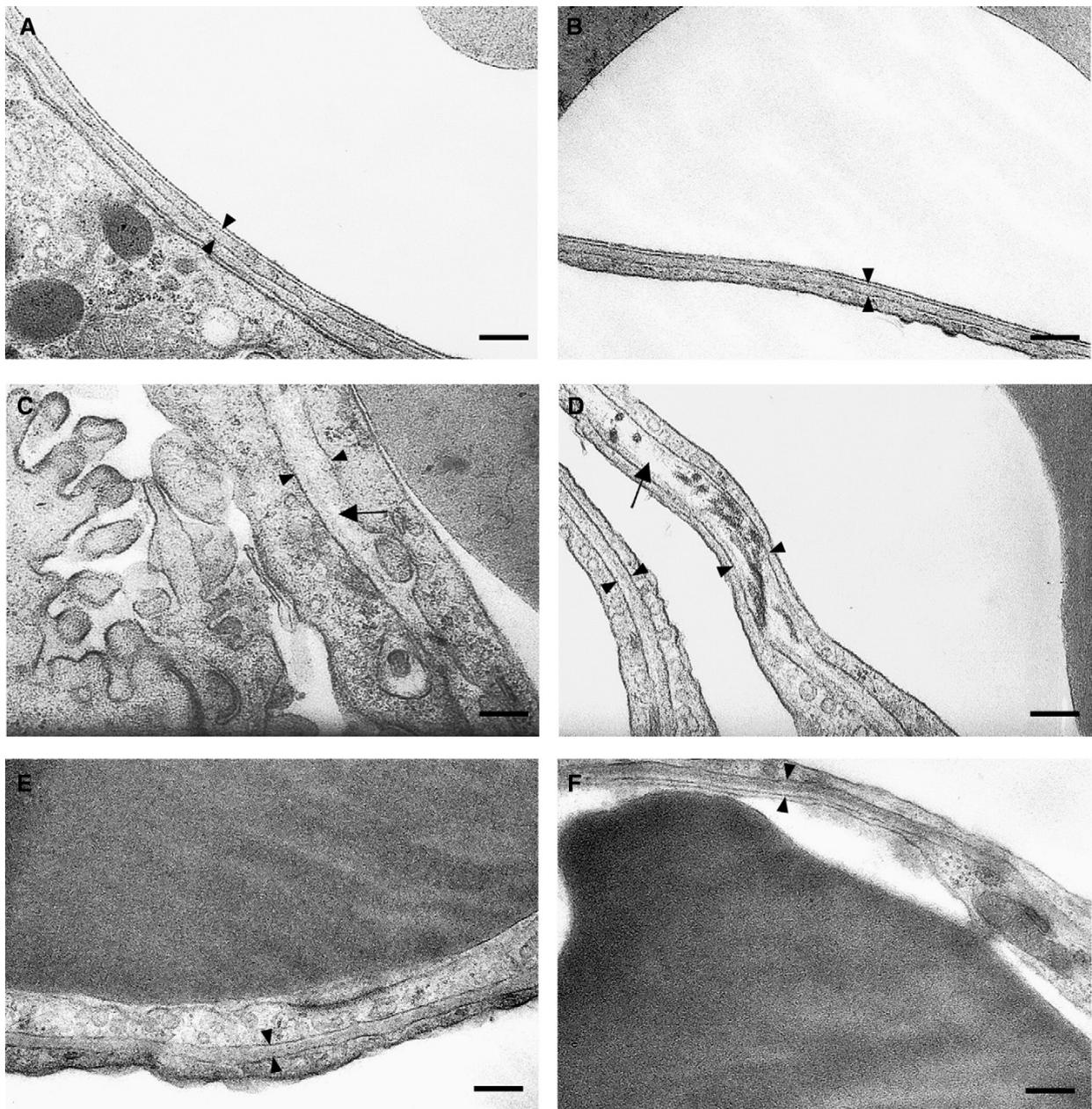


Fig. 1. Ultrastructure of the lung alveolar basement membrane from control, VAD and RR rats. The electron microphotographs show segments of the alveolar BM which results from the fusion of alveolar epithelial and capillary endothelial BMs. Control ABM (A and B) appears with a regular morphology and a normal size. VAD ABM (C and D), on the contrary, is clearly thickened and contains irregularly scattered fibrils (D) of collagenous material. Splitting of an ABM segment is also appreciated (arrows in C and D). In microphotograph D, a less altered segment of the VAD ABM can be seen. Administration of retinoic acid (E and F) reduces the size and practically eliminates the collagen fibrils from the BM. Arrowheads mark the boundaries of the fused BM. Scale bar is 200 nm.

and, as can be seen, the fibrils appear dispersed in different orientations along the BM and occasionally attached in clusters to the plasma membrane of the endothelial cells. In order to find out whether these fibrils were composed of collagen I, sections from control, VAD and RR rat lung embedded in Lowicryl K4M were used for an immunogold

procedure using a polyclonal anti-collagen I antibody. Subsequent analysis allowed the detection of gold particles into the structure of VAD ABM (Fig. 3B) which were absent in the control group and very scarce after retinoic acid treatment. In agreement with the immunological results, measurements of fibril width showed no significant

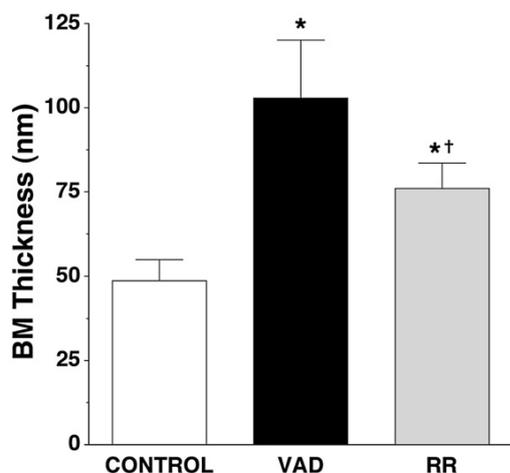


Fig. 2. Thickness of the lung alveolar basement membrane from control, VAD and RR rats. Morphometric analysis was done on electron micrographs of the fused alveolar BM as described in Methods and Materials. VAD doubles the thickness of the ABM, and treatment with retinoic acid reverses, but not totally, its size. Histograms represent means $\pm$ S.D.; \*significantly different from the control group; †significantly different from the VAD group;  $P < .001$ .

difference between the intra-BM (45.6 $\pm$ 3.0 nm) and the adjacent connective tissue (47.6 $\pm$ 4.0 nm) fibrils, mainly composed of collagen I, supporting the identification of this collagen as a component of the intra-BM fibrils.

### 3.3. Effect of VAD and retinoic acid treatment on collagen content

In order to elucidate whether the alterations observed in the ABM and the interstitial ECM were accompanied by changes in the amount of its constituent molecules, we determined the amounts of both collagen IV and collagen I, the major components of BMs and ECM, respectively. Immunoblot analysis indicated that, in agreement with the greater size of BM and the accumulation of collagen fibrils in the ECM, the amount of collagen IV was 78% greater (Fig. 4A) and that of collagen I 100% greater (Fig. 4B) in VAD animals than in controls. After intraperitoneal administration of retinoic acid, the amounts of both collagens decreased to values not significantly different from those found in control rats (Fig. 4).

### 3.4. Correlation between the amounts of protein and mRNA for the collagen I subunits

In addition, to check whether the changes in the amount of protein corresponded to those in mRNA, we analyzed the mRNA content for the  $\alpha$ (I) chains that form the molecule of collagen I using real-time RT-PCR. Each mRNA was quantified and normalized to the quantity of  $\beta$ 2 microglobulin mRNA. As shown in Fig. 5, in close agreement with the variations in the amount of collagen I, the levels of the mRNAs for each collagen I chain were increased by about 80% for the  $\alpha$ 1(I) chain and by 75% for the  $\alpha$ 2(I)

chain in VAD and returned to values not significantly different from those of the control group after retinoic acid treatment. The correlation in the changes between the proteins and its corresponding mRNAs indicates that VAD and retinoic acid regulate collagen I expression acting mainly at the mRNA level. However, it cannot be concluded whether they act by modifying  $\alpha$ (I) chain gene transcription or mRNA stability or both. As would be expected from the chain composition of collagen I, the  $\alpha$ 1(I) mRNA to  $\alpha$ 2(I) mRNA ratio is approximately 2 for the control group. The fact that this ratio is maintained in the VAD and RR groups indicates a coordinated regulation of the expression of both  $\alpha$ (I) chains.

### 3.5. Effect of VAD and retinoic acid treatment on the content of inflammatory markers

To determine whether the changes observed in ABM were related to an inflammatory process, we measured in the lung tissue the proinflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , as well as the content of myeloperoxidase, a leukocyte infiltration marker. Table 2 summarizes the results concerning the amount of these molecules for control, VAD and RR groups. As shown, only the amount of myeloperoxidase was affected by VAD and retinoic acid treatment showing a moderate but significant increase in the VAD group of animals.

### 3.6. Effect of VAD and retinoic acid treatment on the amount of TGF- $\beta$ 1

TGF- $\beta$ 1 is a profibrotic cytokine which induces the synthesis of ECM molecules; its expression can be modulated by RARs and it has been associated with the pathogenesis of fibrosing lung diseases. We therefore assessed whether VAD and retinoic acid would modify the TGF- $\beta$ 1 content in the lung. VAD produced a 50% increase in the lung content of active TGF- $\beta$ 1 (13.7 $\pm$ 1.3 vs. 9.2 $\pm$ 1.1 ng/g), and treatment with retinoic acid reduced it to the control value (9.0 $\pm$ 2.3 vs. 9.2 $\pm$ 1.1 ng/g) (Fig. 6). This suggests that TGF- $\beta$ 1 could be a mediator in the effects of VAD and retinoic acid on the lung ECM.

### 3.7. Effect of VAD and retinoic acid treatment on oxidative stress

Reactive oxygen species are known inducers of the expression of TGF- $\beta$ 1 and ECM proteins, and VAD is a condition potentially leading to an imbalance between ROS production and antioxidant defenses in the lung. In consequence, we measured in lung tissue the content of MDA, a product of lipid peroxidation, as an indicator of oxidative stress. The lungs of VAD rats doubled their content of MDA (130 $\pm$ 21 nmol/g) compared to controls (65 $\pm$ 4 nmol/g) and after retinoic acid treatment MDA increased even further (235 $\pm$ 38 nmol/g) to values 80% greater than those of VAD group (Fig. 7). These results show that the intraperitoneal administration of retinoic acid

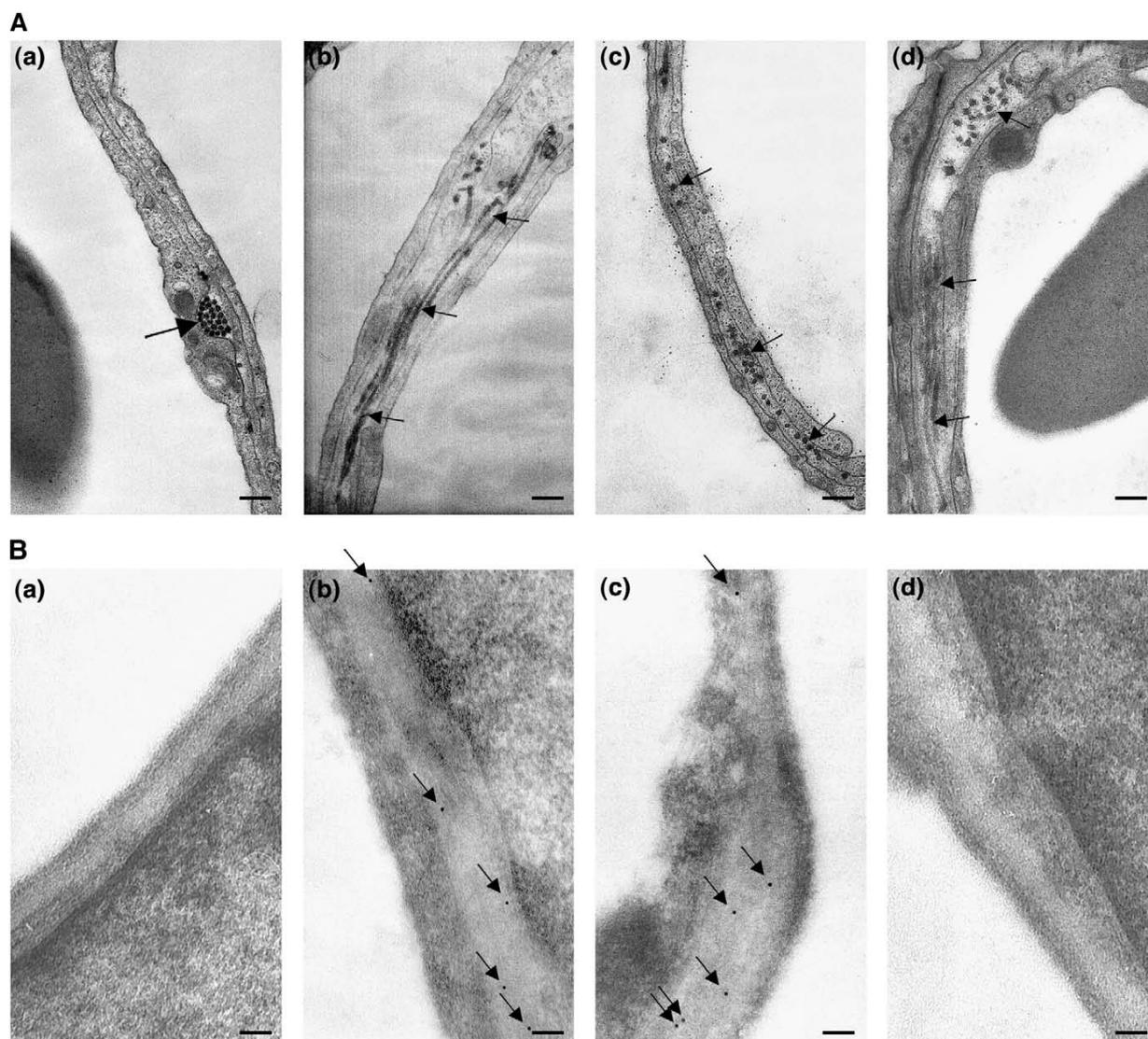


Fig. 3. Conventional electron microscopy and immunocytochemical characterization of the alveolar BM fibrils. (A) Representative segments of the conventional electron microscopy of the fused ABM from VAD lungs (a–d) showing the inclusion of fibrils along the BM (arrows). In (a), the presence of fibril bundles adjacent to the plasma membrane of capillary endothelial cells (arrow) is observed. Scale bar is 200 nm. (B) Gold immunodetection of collagen I inside the alveolar BM. Ultrathin sections of fixed lungs were embedded in Lowicryl, incubated with polyclonal anti-collagen I antibodies and immunorevealed with a gold-labeled second anti-IgG antibody. The electron microphotographs in (B) show the fused ABM from control (a), VAD (b, c), and RR (d) lungs. Scale bar is 75 nm.

to VAD animals worsens their oxidative status and highlight the ability of retinoic acid to revert the alterations of the ECM even in the presence of increased oxidative stress.

#### 4. Discussion

In a previous study [26], we have reported that VAD alters profoundly the renal BMs with modifications such as twofold and sixfold thickening of glomerular and tubular BMs, respectively; the presence of abundant collagen fibrils

in the tubular BM; and a twofold increment in the content of type IV collagen. In the present work, we have analyzed the lung alveolar BM which, like the glomerular BM, contains segments formed by merging epithelial and endothelial BMs. The results indicate that VAD enlarges the lung alveolar BM, induces the ectopic appearance of collagen fibrils in this BM and increases the total amount of both type I and type IV collagens. We also show that these alterations are, at least partially, restored to the control status by treatment with all-*trans*-retinoic acid. The similarities in the modifications of renal and lung BMs

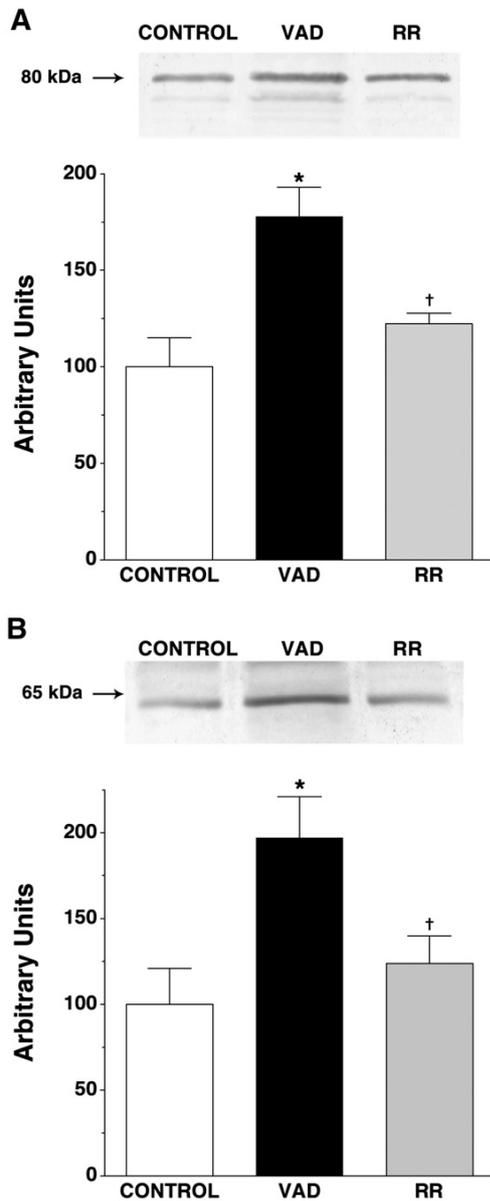


Fig. 4. Quantification of collagen IV and collagen I in the lungs of control, VAD and RR rats. Collagenase solubilized material from control, VAD and RR rat lungs was separated by SDS-PAGE and immunoblotted with polyclonal anti-collagen IV (A) or anti-collagen I (B) antibodies. (A) An accumulating band of 80 kDa was scanned for evaluating the type IV collagen content in the different lungs. (B) An accumulating band of 65 kDa was scanned for evaluating the type I collagen in the different lungs. The histograms represent the densitometric values as percentage of the control group. Data are mean±S.D.; \*significantly different from control group; †significantly different from VAD group;  $P < .0001$ . Insets show a representative Western blot of the quantified bands.

suggest a common mechanism for the effects of VAD on the BMs of different tissues.

The enlargement of BMs is an early event in many diseases. Thickness increases have been described for the

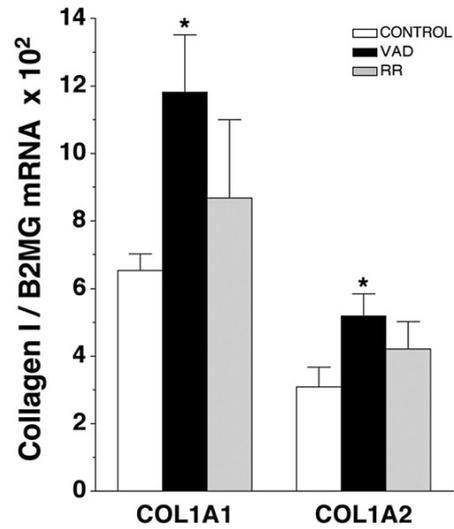


Fig. 5. Quantification of collagen I mRNA in the lungs of control, VAD and RR rats. Total RNA was extracted from the lung tissues, and the mRNAs specific for the two  $\alpha$  chains of collagen I were quantified by real-time RT-PCR. The bars show the mRNA amount for each  $\alpha$ (I) chain normalized to the mRNA for  $\beta$ 2-microglobulin, determined identically in the same sample. Values are mean±S.D.; \*significantly different from control group;  $P < .05$ .

glomerular and alveolar BMs of both diabetic mice and humans [12,33]. Also, bronchial BM thickening occurs in various lung diseases such as bronchial asthma or chronic obstructive pulmonary disease [13,14]. In VAD animals, we report increments in alveolar BM thickness of similar or even greater magnitude with sizes double those of the controls. In addition to thickening, VAD results in splitting of some segments of the fused alveolar BM which divides it into two halves. The splits could represent dissociations of the epithelial and endothelial BMs. These alterations of the alveolar BM may contribute to impairing gas exchange, alveolo-capillary permeability and lung function [17,34].

The VAD alveolar BM also contains abundant, disordered collagen fibrils. Our immunocytochemical analysis indicates that these fibrils are composed of type I collagen.

Table 2

Measurements of cytokines and myeloperoxidase in control, VAD and RR rat lungs

	Control	VAD	RR
IL-1 $\alpha$ (ng/g tissue)	11.23±1.86 (5)	9.23±0.43 (5)	10.68±0.23 (4)
IL-1 $\beta$ (ng/g tissue)	8.37±0.79 (5)	8.83±0.96 (5)	9.57±2.12 (4)
TNF $\alpha$ (ng/g tissue)	0.97±0.26 (5)	1.04±0.24 (5)	0.78±0.13 (4)
Myeloperoxidase (arbitrary units/g of tissue)	371.97±59.97 (6)	503.60±96.30 (7)*	420.37±66.24 (4)

Values are expressed as mean±S.D., with the number of animals indicated in parenthesis; \*significantly different from control group;  $P < .05$ .

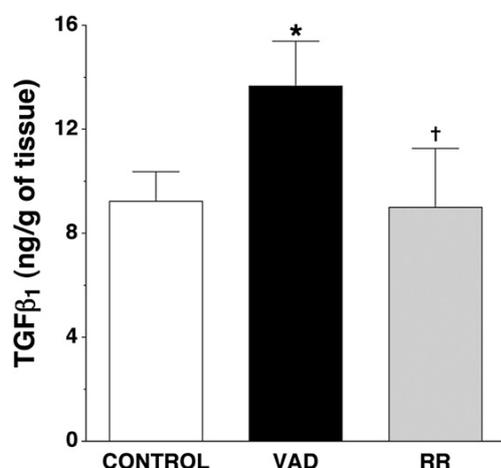


Fig. 6. TGF- $\beta$ 1 content in the lungs of control, VAD and RR rats. Pieces of lung tissue were homogenized in Triton X-100 with protease inhibitors, and active TGF- $\beta$ 1 was determined in the solubilized material by enzyme-linked immunosorbent assay. Values are presented as mean $\pm$ S.D.; \*significantly different from control group; †significantly different from VAD group;  $P < .01$ .

However, it cannot be excluded that other fibrillar collagens such as collagen III and V are also constituents of the fibrils. Nevertheless, the similar width between the BM fibrils and those of the underlying interstitial collagen suggests that they are mainly or exclusively composed of collagen I. The proportionality between the increments in total collagen IV content and alveolar BM thickness indicates also that there is no change in the collagen IV density of VAD lung BM.

Such alterations as alveolar BM thickening and collagen deposition both within the BM and within the interalveolar septae have been observed in the two most common subtypes of idiopathic pulmonary fibrosis [35] and in patients with bronchiolitis obliterans syndrome, the chronic graft failure which develops in lung transplant recipients [36]. The authors show data supporting the possibility that immune-based microvascular endothelial cell injury is involved in the evolution of lung BM abnormalities and of excessive collagen deposition within the terminal lung parenchyma characteristic of these pathologies. It cannot be deduced from our study whether this is also the case in VAD. However, the increase we have detected in myeloperoxidase activity, indicative of inflammatory cell infiltration of the VAD lung, could fit in this possibility. A VAD-induced oxidative insult to the endothelial cells could induce the expression of adhesion molecules and cytokines in the microvascular endothelium which would recruit and activate inflammatory cells triggering the fibrotic process [37]. In fact, we demonstrate that the lungs of the VAD rats are under oxidative stress as manifested by the increase in their MDA content. The infiltration of inflammatory cells together with the presence of areas of interstitial pneumonitis with increased collagen has already been observed in the lungs of VAD rats [18]. However, in spite of the leucocyte

infiltration, the absence of increments in proinflammatory interleukins, such as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ , in the lungs of our VAD rats indicates that the inflammatory process is present but mild.

On the contrary, in VAD lungs there is an increase in the active form of a fibrogenic factor, TGF- $\beta$ 1, which decreases to the control value by retinoic acid treatment. As TGF- $\beta$ 1 is able to induce the synthesis of collagens I, III and IV [38,39], it could be a mediator in the effects of VAD and retinoic acid on the ECM of rat lungs. Based on the information provided in the literature, the relationship between retinoids and the TGF- $\beta$  system appears quite complex and the results published on the effects of retinoic acid on the expression of TGF- $\beta$ 1 are conflicting. However, in line with our data, treatment with retinoic acid reduced significantly the glomerular TGF- $\beta$ 1 protein content in an experimental model of glomerulonephritis with elevated TGF- $\beta$ 1 expression [40]. Additionally, it has been proposed that retinoic acid receptors may function as activators of the TGF- $\beta$ /Smad pathway in the absence of retinoic acid or as inhibitors in its presence [41]. Although many cell types are able to synthesize TGF- $\beta$ 1, the close agreement in the degree of variation of MPO and TGF- $\beta$ 1 in both VAD and RR lungs leads to considering the inflammatory cells as its main source. Increased expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA by alveolar macrophages associated with sites of active fibrosis has already been observed in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis [42]. In this context, it is worthy to emphasize the appearance of collagen fibril bundles attached to the plasma membrane of endothelial cells which could be indicative of an endothelial origin for

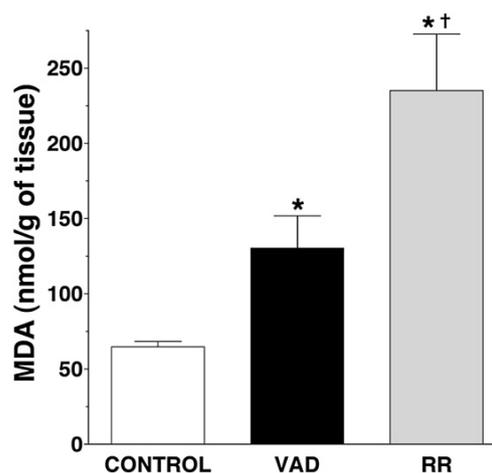


Fig. 7. Effect of VAD and retinoic acid treatment on oxidative stress in rat lung. Control, VAD and RR lungs were assayed for lipid peroxidation as a measure of tissue oxidative stress. Tissue homogenates were incubated with thiobarbituric acid, and the adduct of thiobarbituric acid with MDA was quantified by HPLC. The amount of MDA was considered as an estimation of lipid peroxidation. Data expressed as mean $\pm$ S.D.; \*significantly different from control group; †significantly different from VAD group;  $P < .001$ .

these fibrils and would be in agreement with the involvement of these cells in the fibrotic process.

Alternatively or additionally, the absence of retinoic acid through transcriptional modulation could alter the expression of ECM molecules. Several retinoic acid response elements have been found in the promoter of the  $\alpha 2(I)$  collagen gene. Binding of retinoic acid-activated receptors to these sites inhibits the expression of the  $\alpha 2(I)$  gene without affecting the  $\alpha 1(I)$  gene in hepatic stellate cells [43]. Other authors, on the contrary, have described inhibition by retinoic acid of  $\alpha 1(I)$  gene transcription in human lung fibroblasts [44]. Our results also fit in these findings since VAD results in increments of collagen I and treatment with retinoic acid reverses the situation to the control values. We are not aware of any report on the interaction of retinoic acid receptors with the promoters of collagen IV. However, it is known that these receptors can directly interact with and modify the transcriptional activity of other nuclear factors such as Sp1 which are capable of binding specifically, at least, to the *col4 $\alpha$ 1–col4 $\alpha$ 2* promoter as well as to elements located downstream [45,46]. Therefore, it is also possible that there is a direct implication of retinoic acid in the expression of collagen IV.

With the exception of ABM thickness, treatment with retinoic acid for 10 days restores the alterations induced by VAD to values not significantly different from those of controls. ABM thickness recovers only partially in spite of complete restoration of collagen IV content and disappearance of collagen I fibers from the BM. This fact suggests that other VAD-modified BM components are not recuperated by retinoic acid.

Remarkably, the correcting effect of retinoic acid occurs even in the presence of increased oxidative stress. As compared with the untreated ones, we have found in the RR lungs duplication in their MDA content indicative of increased oxidative stress. The MDA increment induced by retinoic acid seems to be a surprising result in the light of the antioxidant function shown for retinoids [47]. However, many studies in cultured cells have already described the pro-oxidant action of retinoic acid and other vitamin A derivatives [48–50]. In this sense and in agreement with our result, it has been published recently that retinoic acid induces a pro-oxidant condition in cultured Sertoli cells, leading to increased lipid peroxidation, DNA oxidative damage and cell death [50,51]. These effects occur at concentrations higher than 1  $\mu$ M and appear to be mediated by the generation of reactive oxygen species [50]. The pharmacokinetics in serum and brain of intraperitoneal injections of rats with retinoic acid [52] suggest that micromolar concentrations could be achieved in the RR lungs with the retinoic acid treatment we have used. The amount injected of retinoic acid (0.4 mg/kg daily for 10 days) is similar to that used by others (0.5 mg/kg daily for 12 days) to reverse the anatomical characteristics of elastase-induced emphysema in rats and to induce septation in a rat model of pharmacologically caused failure of septation [4].

The mechanism of lipid peroxidation induced by retinoic acid is not fully clarified yet. However, based on published works several possibilities exist. Superoxide and carbon-centered radicals could be generated by autoxidation of retinoic acid, similarly to what has been observed with retinol and retinal [48]. The autoxidation could be enhanced in the lung due to its high  $pO_2$  [53]. Additionally, retinoic acid could stimulate the VAD-initiated autoxidation of unsaturated fatty acids [54] whose concentration, in turn, could be increased due to the activation by retinoic acid of  $\Delta^6$ -desaturase [55]. Finally, retinoic acid or its oxidative-cleavage products could inhibit oxidative phosphorylation leading to enhanced formation of reactive oxygen species [56]. All these mechanisms could act concertedly.

It is worthy to consider here that reactive oxygen derivatives, acting as secondary intracellular messengers, have been shown to activate transcription factors such as activated protein-1 and to induce the synthesis of the fibrogenic cytokine TGF- $\beta$ 1 and of various ECM proteins.  $H_2O_2$  increases by twofold the synthesis of collagens I, III and IV in human mesangial cells through activation of the TGF- $\beta$ 1 system [25]. In consequence, the ability of retinoic acid to reestablish the control values for the VAD-modified ECM proteins in the presence of elevated oxidative stress indicates that retinoic acid mediates this effect through its action on nuclear receptors or another unknown mechanism and not by acting as an antioxidant.

In brief and based on our and others' results, we suggest the following events as a possible mechanism. The oxidative stress induced by VAD triggers the production of TGF- $\beta$ 1, probably by activated leucocytes and mediated by activated/injured epithelial/endothelial cells [25,42]. TGF- $\beta$ 1 in paracrine action induces the expression of type I and type IV collagens in fibroblasts and epithelial–endothelial cells [25,38,39]. This effect could be enhanced by the absence of retinoic acid. When administered, retinoic acid counteracts the action of TGF- $\beta$ 1 by two ways, repressing its synthesis [40] and interfering with the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. Retinoic acid receptors would function as activators of the TGF- $\beta$ /Smad pathway in VAD lungs and as inhibitors in retinoic acid-treated ones [41]. Retinoic acid could also directly modulate the expression of the ECM proteins [43–46].

To conclude, we provide novel insights on how chronic VAD during the growing period alters the ECM and how retinoic acid administration reverses the alterations. Specifically, this work demonstrates that VAD results in abnormalities of the lung ECM such as duplication of the ABM thickness, similar increments in the total amount of collagens I and IV, and appearance of collagen fibers in the ABM. These changes are accompanied by increases in MPO activity, active TGF- $\beta$ 1 content and MDA production. Treatment with retinoic acid restores the alterations to the control values except for the BM thickness, which recovers only partially, and for the MDA, which increases even further. The VAD-induced abnormalities of the lung ECM

are a common finding in patients with fibrotic diseases [35,36] suggesting them as a possible early pathogenic step and a contributing factor in the development of these diseases. Our results highlight the ability of retinoic acid to correct alterations of the ECM even though there is a high level of oxidative stress. However, it must be considered also that treatment with moderate amounts of retinoic acid, at least in VAD lungs, increases oxidative stress which could lead to unwanted deleterious effects.

### Acknowledgments

The authors thank Dra. María Gabaldón (Centro de Investigación, Hospital “La Fe”, Valencia) for her kind and skillful help in performing the whole animal perfusion and fixation.

### References

- [1] Biesalski HK, Nohr D. Importance of vitamin-A for lung function and development. *Mol Aspects Med* 2003;24:431–40.
- [2] Chytil F. Retinoids in lung development. *FASEB J* 1996;10:986–92.
- [3] Massaro D, Massaro GD. Pulmonary alveoli: formation, “the call for oxygen”, and other regulators. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L345–58.
- [4] Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment partially rescues failed septation in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L955–60.
- [5] Veness-Meehan KA, Bottone F, Stiles A. Effects of retinoic acid on airspace development and lung collagen in hyperoxia-exposed newborn rats. *Pediatr Res* 2000;48:434–44.
- [6] Veness-Meehan KA, Pierce RA, Moats-Staats BM, Stiles AD. Retinoic acid attenuates O<sub>2</sub>-induced inhibition of lung septation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L971–80.
- [7] Shenai JP, Kennedy KA, Chytil F, Stahlman MT. Clinical trial of vitamin A supplementation in infants susceptible to bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 1987;111:269–77.
- [8] Aird FK, Greene SA, Ogston SA, Macdonald TM, Mukhopadhyay S. Vitamin A and lung function in CF. *J Cyst Fibros* 2006;5:129–31.
- [9] Baybutt RC, Molteni A. Vitamin A and emphysema. *Vitam Horm* 2007;75:385–401.
- [10] Freyer AM, Johnson SR, Hall IP. Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:569–76.
- [11] Nguyen NM, Senior RM. Laminin isoforms and lung development: all isoforms are not equal. *Dev Biol* 2006;294:271–9.
- [12] Carlson EC, Audette JL, Veitenheimer NJ, Risan JA, Laturus DI, Epstein PN. Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice. *Anat Rec Part A* 2003;271A:332–41.
- [13] Shahana S, Björnsson E, Lúdvíksdóttir D, Janson C, Nettelbladt O, Venge P, et al. Ultrastructure of bronchial biopsies from patients with allergic and non-allergic asthma. *Respir Med* 2005;99:429–43.
- [14] Kranenburg AR, Willems-Widyastuti A, Moori WJ, Sterk PJ, Alagappan VK, de Boer WI, et al. Enhanced bronchial expression of extracellular matrix proteins in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Pathol* 2006;126:725–35.
- [15] Matsui T. Differential activation of the murine laminin B1 gene promoter by RAR $\alpha$ , ROR $\alpha$ , and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:405–10.
- [16] Salbert G, Fanjul A, Piedrafita FJ, Lu XP, Kim SJ, Tran P, et al. Retinoic acid receptors and retinoid X receptor- $\alpha$  down-regulate the transforming growth factor- $\beta$ 1 promoter by antagonizing AP-1 activity. *Mol Endocrinol* 1993;7:1347–56.
- [17] McGowan SE, Smith J, Holmes AJ, Smith LA, Businga TR, Madsen MT, et al. Vitamin A deficiency promotes bronchial hyperactivity in rats by altering muscarinic M<sub>2</sub> receptor function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L1031–9.
- [18] Baybutt RC, Hu L, Molteni A. Vitamin A deficiency injures lung and liver parenchyma and impairs function of rat type II pneumocytes. *J Nutr* 2000;130:1159–65.
- [19] McGowan SE, Holmes AJ. Vitamin A deficiency alters pulmonary parenchymal collagen and tissue mechanics. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;156:312–9.
- [20] Olsen CO, Isakson BE, Seedorf GJ, Lubman RL, Boitano S. Extracellular matrix-driven alveolar epithelial cell differentiation in vitro. *Exp Lung Res* 2005;31:461–82.
- [21] Guo Y, Martinez-Williams C, Yellowley CE, Donahue HJ, Rannels DE. Connexin expression by alveolar epithelial cells is regulated by extracellular matrix. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L191–202.
- [22] Lima e Silva R, Kachi S, Akiyama H, Shen J, Aslam S, Yuan Gong Y, et al. Recombinant non-collagenous domain of  $\alpha$ 2(IV) collagen causes involution of choroidal neovascularization by inducing apoptosis. *J Cell Physiol* 2006;208:161–6.
- [23] Barber T, Borrás E, Torres L, García C, Cabezuolo F, Lloret A, et al. Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic Biol Med* 2000;29:1–7.
- [24] Gatica L, Alvarez S, Gomez N, Zago MP, Oteiza P, Oliveros L, et al. Vitamin A deficiency induces prooxidant environment and inflammation in rat aorta. *Free Radic Res* 2005;39:621–8.
- [25] Iglesias-De la Cruz MC, Ruiz-Torres P, Alcamí J, Diez-Marqués L, Ortega Velázquez R, Chen S, et al. Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF- $\beta$  in human mesangial cells. *Kidney Int* 2001;59:87–95.
- [26] Marín MP, Esteban-Pretel G, Alonso R, Sado Y, Barber T, Renau-Piqueras J, et al. Vitamin A deficiency alters the structure and collagen IV composition of rat renal basement membranes. *J Nutr* 2005;135:695–701.
- [27] Renau-Piqueras J, Zaragoza R, De Paz P, Báguena-Cervellera R, Megías L, Guerri C. Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1989;37:229–40.
- [28] Podda M, Weber C, Traber MG, Milbradt R, Packer L. Sensitive high performance liquid chromatography techniques for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols, ubiquinol and ubiquinone in biological samples. *Methods Enzymol* 1999;299:330–41.
- [29] Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier A. Simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991;572:103–16.
- [30] Dewald B, Baggiolini M. Methods for assessing exocytosis by neutrophil leukocytes. *Methods Enzymol* 1986;132:267–77.
- [31] Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach Jr CN, Sunderman Jr FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987;33:214–20.
- [32] Mansego ML, Blesa S, González-Albert V, Tormos MC, Saez G, Redón J, et al. Discordant response of glutathion and thioredoxin systems in human hypertension? *Antioxid Redox Signal* 2007;9:507–14.
- [33] Weynand B, Jonckheere A, Frans A, Rahier J. Diabetes mellitus induces thickening of the pulmonary basal lamina. *Respiration* 1999;66:14–9.
- [34] Guazzi M, Oreglia I, Guazzi MD. Insulin improves alveolar-capillary membrane gas conductance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1802–6.

- [35] Magro CM, Waldman WJ, Knight DA, Allen JN, Nadasky T, Frambach GE, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis related to endothelial injury and antiendothelial cell antibodies. *Hum Immunol* 2006;67:284–97.
- [36] Magro CM, Shusterman BD, Pope-Harman AL, Ross Jr P. Ultrastructure as a diagnostic adjunct in the evaluation of lung allograft biopsies. *Ultrastruct Pathol* 2005;29:95–106.
- [37] Jacobi J, Kristal B, Chezar J, Shaul SM, Sela S. Exogenous superoxide mediates pro-oxidative, proinflammatory, and procoagulatory changes in primary endothelial cell cultures. *Free Radic Biol Med* 2005;39:1238–48.
- [38] Douthwaite JA, Johnson TS, Haylor JL, Watson P, El Nahas AM. Effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 on renal extracellular matrix components and their regulating proteins. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2109–19.
- [39] Fine A, Goldstein RH. The effect of transforming growth factor- $\beta$  on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1987;262:3897–902.
- [40] Morath C, Dechow C, Lehrke I, Haxsen V, Waldherr R, Floege J, et al. Effects of retinoids on the TGF- $\beta$  system and extracellular matrix in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2300–9.
- [41] Pendaries V, Verrecchia F, Michel S, Mauviel A. Retinoic acid receptors interfere with the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in a ligand-specific manner. *Oncogene* 2003;22:8212–20.
- [42] Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor  $\beta$ 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6642–6.
- [43] Wang L, Tankersley LR, Tang M, Potter JJ, Mezey E. Regulation of the murine  $\alpha$ 2(I) collagen promoter by retinoic acid and retinoid X receptors. *Arch Biochem Biophys* 2002;401:262–70.
- [44] Krupsky M, Fine A, Berk JL, Goldstein RH. Retinoic acid-induced inhibition of type I collagen gene expression by human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1994;1219:335–41.
- [45] Pollner R, Schmidt C, Fisher G, Kühn K, Pöschl E. Cooperative and competitive interaction of regulatory elements are involved in the control of divergent transcription of human COL4A1 and COL4A2 genes. *FEBS Lett* 1997;405:31–6.
- [46] Shimada J, Suzuki Y, Kim SJ, Wang PC, Matsumura M, Kojima S. Transactivation via RAR/RXR-Sp1 interaction: characterization of binding between Sp1 and GC box motif. *Mol Endocrinol* 2001;15:1677–92.
- [47] Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Rad Biol Med* 1999;26:746–61.
- [48] Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem* 2000;275:2003–8.
- [49] Gimeno A, Zaragoza R, Vivó-Sesé I, Viña JR, Miralles VJ. Retinol, at concentrations greater than the physiological limit, induces oxidative stress and apoptosis in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 2004;13:45–54.
- [50] Conte da Frota Jr ML, Gomes da Silva E, Behr GA, Roberto de Oliveira M, Dal-Pizzol F, Klamt F, et al. All-*trans* retinoic acid induces free radical generation and modulates antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. *Mol Cell Biochem* 2006;285:173–9.
- [51] Pasquali MAB, Gelain DP, Zanotto-Filho A, de Souza LF, de Oliveira RB, Klamt F, et al. Retinol and retinoic acid modulate catalase activity in Sertoli cells by distinct and gene expression-independent mechanisms. *Toxicol in Vitro* 2008;22:1177–83.
- [52] Le Doze F, Debruyne D, Albessard F, Barre L, Defer GL. Pharmacokinetics of all-*trans* retinoic acid, 13-*cis* retinoic acid, and fenretinide in plasma and brain of rat. *Drug Metab Dispos* 2000;28:205–8.
- [53] Palozza P, Luberto C, Calviello G, Ricci P, Bartoli GM. Antioxidant and prooxidant role of  $\beta$ -carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1065–73.
- [54] Freyaldenhoven MA, Lehman PA, Franz TJ, Lloyd RV, Samokyszyn VM. Retinoic acid-dependent stimulation of 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-initiated autoxidation of linoleic acid in sodium dodecyl sulfate micelles: a novel prooxidant effect of retinoic acid. *Chem Res Toxicol* 1998;11:102–10.
- [55] Alam SQ, Alam BS, Chen TW. Activities of fatty acid desaturases and fatty acid composition of liver microsomes in rats fed  $\beta$ -carotene and 13-*cis* retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1984;792:110–7.
- [56] Siems W, Sommerburg O, Schild L, Augustin W, Langhans CD, Wiswedel I.  $\beta$ -Carotene cleavage products induce oxidative stress in vitro by impairing mitochondrial respiration. *FASEB J* 2002;16:1289–91.

## Biochemical and Molecular Actions of Nutrients

### Vitamin A Deficiency Alters the Structure and Collagen IV Composition of Rat Renal Basement Membranes<sup>1</sup>

M. Pilar Marín, Guillermo Esteban-Pretel, Ruth Alonso, Yoshikazu Sado,\* Teresa Barber, Jaime Renau-Piqueras,<sup>†</sup> and Joaquín Timoneda<sup>2</sup>

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; \*Division of Immunology, Shigei Medical Research Institute, Okayama, Japan; and <sup>†</sup>Centro de Investigación, Hospital "La Fe," Valencia, Spain*

**ABSTRACT** Retinoids can modulate the expression of extracellular matrix (ECM) proteins with variable results depending on other contributing factors. Because changes in these proteins may alter the composition and impair the function of specialized ECM structures such as basement membranes (BMs), we studied the effects of vitamin A deficiency on renal BMs during the growing period. Newborn male rats were fed a vitamin A-deficient (VAD) diet for 50 d. The ultrastructure of renal BMs was analyzed by electron microscopy. Total collagen IV, the different  $\alpha$ (IV) chains, matrix degrading metalloproteinases (MMP), and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) were quantified by immunocytochemistry and/or Western blotting. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  were measured by ELISA. Semiquantitative RT-PCR was used for determining the steady-state levels for each  $\alpha$ (IV) chain mRNA. VAD renal BMs showed an irregular thickening, particularly tubular BM. The total collagen IV content was increased, but there was a differential expression of the collagen IV chains. The protein amounts for  $\alpha$ 1(IV),  $\alpha$ 4(IV), and  $\alpha$ 5(IV) were similarly increased, whereas  $\alpha$ 2(IV) and  $\alpha$ 3(IV) were decreased. The levels of mRNA for each collagen IV chain changed in parallel with those of the corresponding protein. Both MMP2 and MMP9 were diminished, but no change was detected in TIMP1 or TIMP2. Our data indicate that nutritional VAD leads to alterations in the structure of renal BMs and to quantitative and qualitative variations in its collagen IV composition. These changes may be a factor predisposing to or resulting in kidney malfunction and renal disease. *J. Nutr.* 135: 695–701, 2005.

**KEY WORDS:** • collagen IV • vitamin A • basement membranes • rat kidney • metalloproteinase

Vitamin A and its derivatives, the retinoids, have a profound influence on organ development, cell proliferation, and cell differentiation (1), and their deficiency originates or predisposes to a range of disabilities. In the case of kidney development, even mild vitamin A deficiency (VAD)<sup>3</sup> in pregnant rats results in a reduced number of nephrons in the fetuses, leading to a permanent deficit in adulthood (2). Conversely, retinoids have proved to be an effective treatment in several models of renal damage (3).

The basement membrane (BM) is a specialized structure of the extracellular matrix (ECM), composed of type IV collagens, laminins, entactin, and proteoglycans, which also has a crucial effect on kidney organogenesis and cell differentiation,

and mutations affecting its components lead to inherited forms of renal disease. Moreover, alterations in BM structure or composition are associated with a variety of kidney disorders (4). Mammalian BMs contain 6 known collagen IV  $\alpha$  chains with tissue- and development-specific patterns of expression. The  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 chains are abundant in most BMs, suggesting their importance in embryonic development but  $\alpha$ 3–6(IV) chains are selectively expressed in BMs and appear relatively late in development. Thus, the loss or alteration of any  $\alpha$  chain may have tissue-specific consequences (5). Targeted deletion of the mouse *Col4a3* gene results in progressive glomerulonephritis leading to death by renal failure (6). Dramatic changes in the structure of the BM, including ectopic deposition of BM components such as collagen  $\alpha$ 1(IV),  $\alpha$ 2(IV), perlecan, and fibronectin, appear before detectable functional defects. Undesirable loss of mesangial and other normal resident cells by unscheduled apoptosis also occurs in glomerular inflammation, progressing to glomerulosclerosis coincident with changes in the amount and composition of ECM. Interestingly, ECM components have a differential capacity to protect rat mesangial cells from induced apoptosis. Collagen IV and laminin, normal constituents of mesangial ECM, suppress cell apoptosis but collagen I and fibronectin, abnormally expressed in the mesangium of diseased glomeruli, do not do so

<sup>1</sup> Supported by Generalitat Valenciana grant GV-D-VS-20-164-96 and Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER-FES)-Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) grant 02/1010. G.E. was the recipient of a fellowship from the Generalitat Valenciana.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: Joaquin.Timoneda@uv.es.

<sup>3</sup> Abbreviations used: ac, area of the compartment; BM, basement membrane; ECM, extracellular matrix; GBM, glomerular basement membrane; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; NC, noncollagenous; RAR, retinoic acid receptor; TBM, tubular basement membrane; TGF, transforming growth factor; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; TNF, tumor necrosis factor; VAD, vitamin A deficient or vitamin A deficiency.

(7). Unfortunately, it is not known whether these differential capacities prevail also for the different subunits of the ECM molecules.

As a common link, retinoids modulate the production of BM and other extracellular matrix proteins by a variety of cells *in vivo* and *in vitro*, indicating that alterations in the structure and composition of BMs could mediate in the negative effects of VAD. However, the effects of retinoids on the expression of BM components appear to vary depending on the cell type, the culture conditions, or the presence of a structured ECM (8–10). Moreover, retinoids could also affect BMs *in vivo* by modifying the oxidative stress or the development of an inflammatory response. It was shown that VAD induces rat colonic inflammation with the deposition of collagen and that feeding a vitamin A-supplemented diet ameliorates the inflammatory process in experimentally induced colitis (11). The discrepancies observed between the effects *in vitro* or *in vivo* (12) are a reflection of the pleiotropic actions of retinoids and support the importance of analyzing the effects of VAD *in vivo*.

Much knowledge has been obtained concerning the actions of retinoids on the expression of ECM macromolecules *in vitro* and the reciprocal influence of these molecules on the response of cells to growth factors. However, little is known about the effect of a deficiency of vitamin A on the composition of BMs *in vivo*, and no study has examined its effects on the subunit composition of BM macromolecules. In the present study, we analyzed by electron microscopy, immunocytochemistry, Western blotting, and RT-PCR the structure and collagen composition of renal BM in rats fed a VAD diet during their postnatal growth. We also determined in renal tissue 2 proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$ .

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

Mouse monoclonal antibodies (H11, H22, H31, H44, H52, H65) against each of the 6 human  $\alpha$ (IV) chains were prepared as described (13). Rabbit polyclonal antibodies anti-bovine collagen IV and anti-bovine 7S(IV) were a kind gift of Dr. B. G. Hudson (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN). Commercial primary antibodies were as follows: rabbit polyclonal anti-human metalloproteinase (MMP)9 (M-5302, Sigma), rabbit polyclonal anti-human tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)1 (T-8187, Sigma) or anti-human TIMP2 (T-7937, Sigma), and mouse monoclonal anti-human MMP2 (clone 42–5D11, Calbiochem). Secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase, peroxidase, or colloidal gold (5 or 10 nm) were from Promega, Bio-Rad, or Sigma, respectively. Oligonucleotides used as primers for RT-PCR were synthesized by Roche Diagnostics. Chemicals for electron microscopy were from Electron Microscopy Science. Other reagents were of analytical grade.

### Animal treatment

VAD rats were prepared as previously described (14). Briefly, pregnant Wistar female rats (Charles River) were randomly assigned either to a control or to a VAD group and housed in individual cages in a room maintained at 22–25°C with a 12-h light:dark cycle. The day after delivery, the dams of the control group with their pups were fed a complete solid diet (AIN-93, ICN). The dams of the VAD group with their pups were fed the same diet but devoid of vitamin A. After 21 d of lactation, male pups of each group were weaned onto their corresponding dam diet until they were 50 d old. Control rats were pair-fed the mean intake of the VAD group.

### Tissue sample preparation

Blood and kidney samples for biochemical studies were processed as previously described (15) and stored frozen until they were used. For ultrastructural and immunocytochemical studies, whole anesthetized rats were perfused with 0.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 mol/L cacodylate buffer, pH 7.4.

**Samples for ultrastructural studies.** Small fragments of kidney were postfixed, dehydrated, and embedded in Epon 812 as described (16). Ultrathin sections were examined in a Philips CM 100 Transmission Electron Microscope.

**Samples for immunocytochemistry.** Small fragments of kidney were postfixed, dehydrated, and embedded in Lowicryl K4M after the progressive lowering temperature procedure as described (17).

### Retinol determination

Plasma retinol concentration was determined by the isocratic HPLC method of Arnaud et al. (18). A Nova-pak C-18 column (3.9  $\times$  150 mm, Waters) and a mixture of acetonitrile:dichloromethane:methanol (70:20:10), as eluent, were used.

Kidney retinoids were extracted as described (19), dissolved in methanol:ethanol (1:1), and measured by reversed-phase gradient HPLC following a published method (20) but using a Nova-pak C-18 column (3.9  $\times$  150 mm, Waters).

### Determination of TGF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ in kidney

Pieces of frozen kidney (0.1 g) were homogenized in 1 mL of 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 containing 0.1% Triton X-100 and 5  $\mu$ L of protease inhibitor cocktail for mammalian tissue extracts (Sigma), sonicated twice for 30 s with cooling, and centrifuged at 450000  $\times$  g for 10 min. The supernatants were analyzed for TGF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  contents by a commercial ELISA kit (Cytokine ELISA assay) as recommended by the manufacturer.

### Solubilization of MMPs, TIMPs, and noncollagenous domains (NC1) of collagen IV

Kidney (0.1 g) was homogenized in 2 mL of Tris-HCl 50 mmol/L pH 7.5 containing 0.25% (v:v) Triton X-100, 4% SDS, and the following protease inhibitors: N-ethylmaleimide (4 mmol/L), benzamide (5 mmol/L), 6-aminohexanoic acid (25 mmol/L) and phenylmethylsulfonyl fluoride (2 mmol/L). The suspension was centrifuged and the supernatant stored at –20°C for MMP and TIMP determination by Western blotting.

The pellet was digested extensively with bacterial collagenase (high-purity collagenase, type VII, Sigma) at 37°C for 48 h in digestion buffer consisting of 50 mmol/L HEPES, pH 7.5, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.05% NaN<sub>3</sub>, and the protease inhibitor cocktail mentioned above. The digestion was repeated to confirm that no more collagen fragments were solubilized. The suspensions were centrifuged (8000  $\times$  g, 15 min) and the solubilized material was stored at –80°C until used for determination of the noncollagenous segments of the collagen IV chains.

### Protein quantification by Western blotting

SDS-PAGE was carried out in 10% acrylamide gels (MMPs and TIMPs) or 10–20% acrylamide gradient gels (collagen IV chains) using the buffer system of Laemmli (21). The proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose paper at 150 mA constant current for 18 h at 4°C. Membranes were incubated successively with 5% skimmed milk, the corresponding primary antibodies, and the secondary conjugated antibody in 10 mmol/L Tris-HCl pH 8, 150 mmol/L NaCl and 0.05% Tween 20. Blots were scanned with a SNAP Scan 1236 (AGFA), and protein bands were quantified using the Scion Image program. Linearity ranges were established by blotting different amounts of each sample.

### Semiquantitative analysis of mRNA by RT-PCR

Total RNA was isolated from kidney samples using the Quick Prep total RNA extraction kit as described by the manufacturer (Pharmacia Biotech). All samples were normalized to total RNA, and RT-PCR was performed using the "Enhanced avian RT-PCR kit" as recommended by the supplier (Sigma). S26 ribosomal protein mRNA was amplified as an internal control to normalize the amount of total RNA for each sample. The primers for determining expression of the collagen IV  $\alpha$  chains were complementary to published nucleotide sequences of the globular domains (NC1) of the mouse ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  and  $\alpha 5$ ) (22), rat ( $\alpha 3$ ) (23) or human ( $\alpha 6$ ) (24) chains. These were:  $\alpha 1$ (IV) sense: 5'-ATCTCTGGGGACAACATCCGGC-3' antisense: 5'-CATCTCGCTTCTCTATGGTGGC-3';  $\alpha 2$ (IV) sense: 5'-TGGCTGAGGAGGAAATCAAGCC-3', antisense: 5'-GCTCTGGAAGTTCTGCTCTGG-3';  $\alpha 3$ (IV) sense: 5'-TACTGGC-AGAGCCCTTGAGCC-3', antisense: 5'-CATTCTTTCTGGATT-TAGTGAAGC-3';  $\alpha 4$ (IV) sense: 5'-AGTGCGGCTCCTCTTCC-TATG-3', antisense: 5'-GCGCTGGGCTGAACCTTCTTT-3';  $\alpha 5$ (IV) sense: 5'-TGAAGGACAGAGCAGCATCC-3', antisense: 5'-GTCTGACATATCAACAGTGGC-3';  $\alpha 6$ (IV) sense: 5'-GTC-AGCCAGACCCAGATTCCCAG-3', antisense: 5'-CTCCCCA-AACTGCTGCCTCTC-3'.

To amplify the S26 ribosomal protein RNA, the following primers were used: 5'-CAGCAGGTCTGAATCGTGGT-3' and 5'-AAT-TCGCTGCACGAACTGCG-3'. Reverse transcription was performed at 50°C for 30 min and finished at 94°C for 2 min. Then, the appropriate number of cycles for taking each cDNA PCR products into the exponential phase of amplification was run. The resulting PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel in TBE electrophoresis buffer and stained with ethidium bromide. The intensity of the bands was analyzed following scanner densitometry using analysis software (Gelblot program, UVP Image Store 5000).

### Ultrastructural immunolocalization of collagen IV chains

Collagen IV as well as their  $\alpha$ -chains were located in BM from the proximal tubule epithelium with the immunogold procedure (25) but with an initial incubation of the ultrathin sections in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. After blocking and incubating with primary antibodies and gold-conjugated second antibody, the ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and examined in a Philips CM 100 Transmission Electron Microscope.

### Ultrastructural quantitative analysis

**Morphometric analysis.** The thickness of the BM was determined in randomly selected micrographs at X29400 taken from the glomerulus and proximal tubule epithelium. In each micrograph, the thickness of the BM was measured at intervals of 1  $\mu$ m with a minimum of 10 measurements per micrograph. The minimum sample size was determined by the progressive mean technique (confidence limit,  $\pm 5\%$ ) (16).

**Quantitative immunocytochemistry.** Evaluation of gold particles was carried out by overlaying each electron micrograph with a bidimensional lattice, and then estimating morphometrically the mean area ( $\mu\text{m}^2$ ) [area of the compartment (Ac)] occupied by the BM. Then the labeling density of gold particles was calculated by counting all gold particles falling on each estimated area and dividing this value by Ac (25). The background was determined in a similar manner.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Data are presented as means  $\pm$  SD,  $n = 3-5$ . Significant differences between group means were determined using Student's *t* test and a *P*-value  $< 0.05$ .

## RESULTS

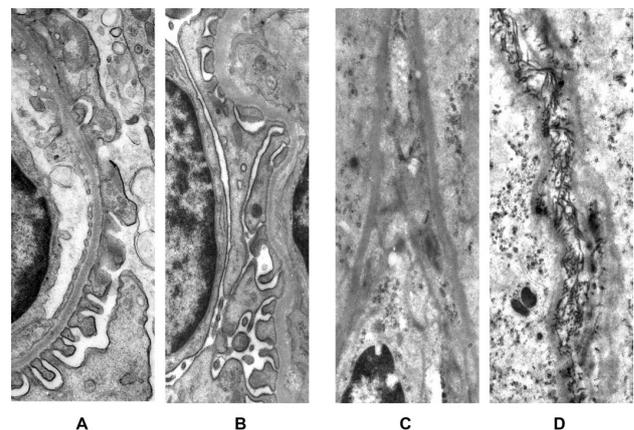
**Retinol status.** Plasma retinol concentrations changed from  $1.23 \pm 0.22 \mu\text{mol/L}$  in control rats to  $0.07 \pm 0.02$

$\mu\text{mol/L}$  in VAD rats. In parallel, control kidneys contained  $3.63 \pm 0.79$  and  $5.18 \pm 0.96 \text{ nmol/g}$  of retinol and retinyl palmitate, respectively, whereas VAD kidneys contained only  $0.19 \pm 0.06$  and  $0.26 \pm 0.10 \text{ nmol/g}$  of these retinoids.

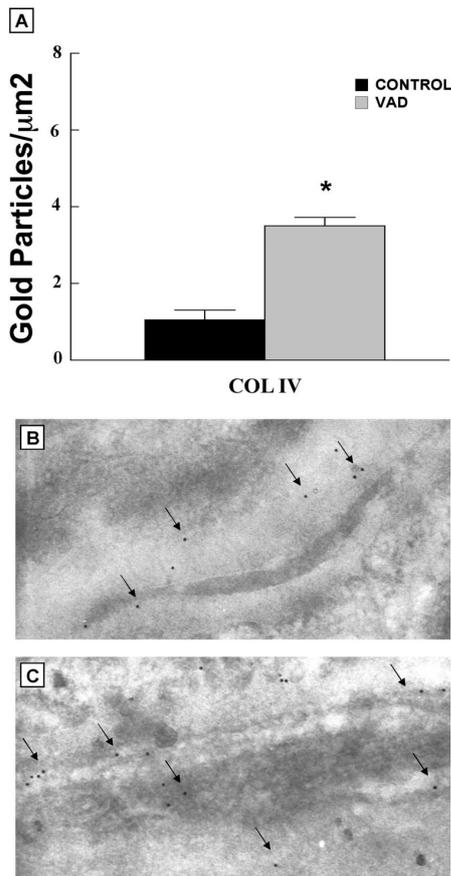
**Effect of vitamin A deficiency on renal basement membrane.** Electron microscopic examination revealed that BM in VAD kidneys was visibly thickened (Fig. 1) although the thickening was not uniform along the entire BM. On average, glomerular BM (GBM) was 2-fold wider in VAD than in control rats (Fig. 1A and B) whereas tubular BM (TBM) was 6-fold thicker (Fig. 1C and D). Moreover, TBM showed an irregular structure with frequent splits (Fig. 1D). It is also particularly noteworthy that in TBM, abundant, disordered collagen fibers appeared emerging from epithelial cells and disrupting the structure of the BM (Fig. 1D). Similarly, the kidney cortex of VAD rats exhibited a disorganized collagen I distribution in the ECM with the frequent presence of irregularly scattered collagen fiber bundles (not shown).

**Effect of vitamin A deficiency on collagen IV content and subunit composition.** In accordance with the morphological alterations observed in renal VAD-BM, the amount of type IV collagen increased 2-fold compared with control BM, as measured by quantitative immunocytochemistry using anti-7S(IV) antibodies (Fig. 2). A similar result (1.5-fold increment) was obtained by Western blotting analysis using polyclonal anti-type IV collagen antibodies (not shown). Because kidney development proceeds postnatally and there is a developmental switch from collagen  $\alpha 1,2$ (IV) to  $\alpha 3-5$ (IV) expression (22), we compared the chain composition of collagen IV in VAD and control kidneys. The quantitative immunocytochemistry showed that the VAD diet induced chain-specific changes in collagen IV composition. The amount of  $\alpha 1$ (IV) chain was 55% greater in VAD-BM, whereas  $\alpha 2$ (IV) was reduced to  $\sim 60\%$  of the control BM. In contrast, the  $\alpha 3$ (IV) chain in VAD-BM decreased to 45% of the control BM and the  $\alpha 4$ (IV) chain increased 55%. Both the  $\alpha 5$ (IV) and  $\alpha 6$ (IV) chains increased in VAD-BM, 50 and 25%, respectively. These results were confirmed by Western blotting analyses (Fig. 3).

To characterize the differences detected in the subunit composition of collagen IV, the relative mRNA content for each  $\alpha$  chain was evaluated by RT-PCR in VAD and control



**FIGURE 1** Electron microphotograph of kidney sections from rats fed a control (A, C) or a VAD diet (B, D) showing the thickening of GBM (A, B) and TBM (C, D). Alterations in the TBM are more prominent than in the GBM. Note the appearance of collagen fibers disrupting the TBM from VAD rats (D). Magnification is X29400.



**FIGURE 2** Immunocytochemical quantification of collagen IV in kidney sections from rats fed a control or a VAD diet. (A) Histograms represent the means  $\pm$  SD of the gold particles/ $\mu\text{m}^2$  in 15 microphotographs from 3 rats. (B1) and (B2) show representative electron microphotographs of the immunocytochemical determination of collagen IV in control and VAD kidney sections, respectively. Magnification is X675000. \*Different from control,  $P < 0.001$ .

kidneys. The results obtained (Fig. 4) were qualitatively similar to those of protein content. The VAD diet induced an  $\sim 70\%$  increase in the amount of  $\alpha 1(\text{IV})$  mRNA and a reduction to 50% in that of  $\alpha 2(\text{IV})$  mRNA. On the contrary,  $\alpha 3(\text{IV})$  mRNA in VAD kidneys decreased to 60% of the control level and  $\alpha 4(\text{IV})$  mRNA increased 25%. Finally,  $\alpha 5(\text{IV})$  mRNA was incremented  $\sim 30\%$  in relation to the control. No mRNA for the  $\alpha 6(\text{IV})$  chain could be detected with the primers used.

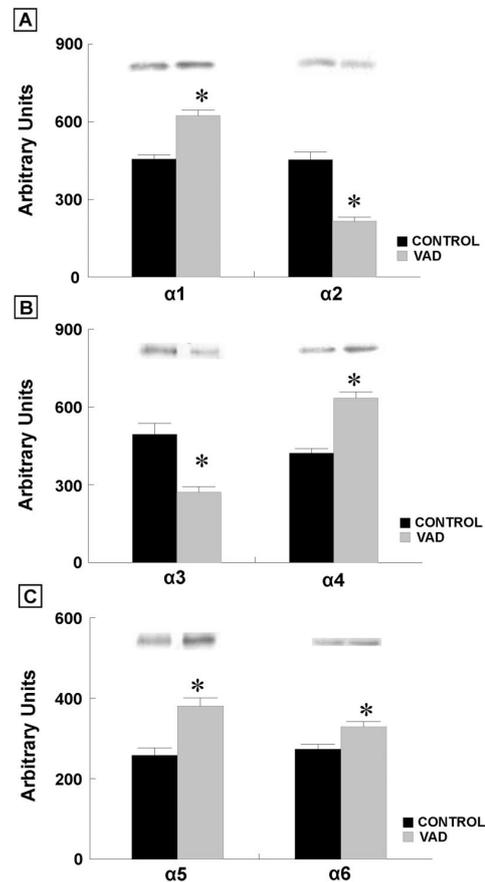
**Effect of vitamin A deficiency on matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors.** Renal BM-degrading proteolytic activity was determined using Western blotting and gel zymography analysis of 2 of the main BM-degrading metalloproteinases, MMP2 and MMP9, and the tissue inhibitors of metalloproteinases, types 1 and 2 (TIMP1 and TIMP2). Densitometry of the corresponding bands in Western blots revealed that both MMPs were decreased in VAD kidneys (Fig. 5A). MMP2 was 36% lower and MMP9 60% lower. These results were consistent with those obtained in gel zymography using gelatin as a substrate (not shown). In contrast, the amounts of TIMP1 and TIMP2 did not differ between VAD and control kidneys (Fig. 5B).

**Kidney proinflammatory cytokine contents.** To determine whether an inflammatory process was acting on VAD kidney, we measured the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  content did not differ between control and VAD kidney ( $5.2 \pm 0.4$  ng/g wet weight for control vs.  $4.3 \pm 0.9$  ng/g wet weight for VAD kidney,  $n = 4$ ,  $P = 0.09$ ). On the contrary, TNF- $\alpha$  was increased in VAD kidney ( $27.3 \pm 2.7$  ng/g wet weight for control vs.  $54.2 \pm 5.7$  ng/g wet weight for VAD kidney,  $n = 4$ ,  $P = 0.001$ ).

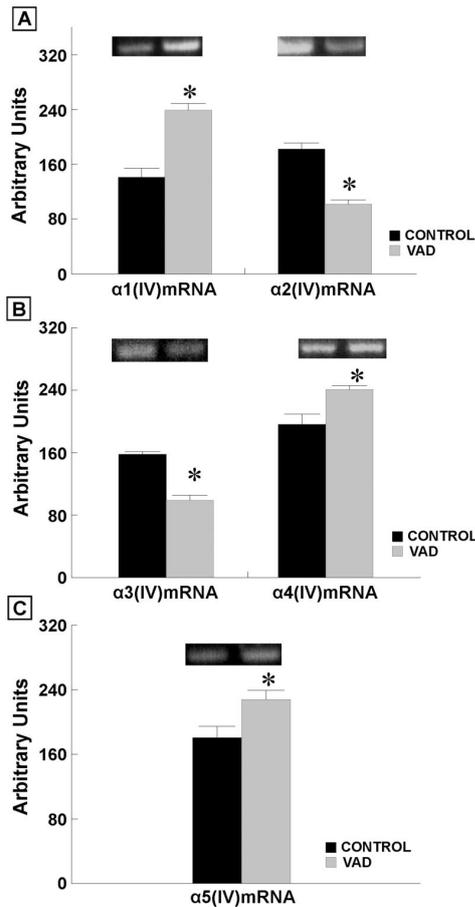
## DISCUSSION

The main purpose of our study was to analyze the consequences of a deficiency in vitamin A on renal BM structure and composition during postnatal kidney development; we showed that VAD results in structurally altered BM with changes in collagen content and chain composition.

The profound reduction in the retinoid content of VAD rats induced a notable increase in the thickness of the GBM and TBM and a disruption of the regular structure in the case



**FIGURE 3** Quantification by Western blotting of the collagen IV  $\alpha$  chains,  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  (A),  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  (B),  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  (C), in kidney extracts from rats fed a control or a VAD diet. Electrotransferred proteins were immunodetected with the corresponding monoclonal anti- $\alpha(\text{IV})$  chain antibody. For each  $\alpha(\text{IV})$  chain, all of the immunorecognized bands, mainly monomeric and dimeric peptides from the NC1 domain, were scanned and quantified. Histograms represent the global densitometric scanning of all of the immunorecognized bands expressed in arbitrary units. Values are means  $\pm$  SD,  $n = 4$ . \*Different from control,  $P < 0.001$ . Inserts show the main monomeric band of representative immunoblots.



**FIGURE 4** Semiquantitative determination by RT-PCR of the steady-state mRNA levels for each collagen IV  $\alpha$  chain,  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  mRNA (A),  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  mRNA (B), and  $\alpha 5$  mRNA (C), in kidneys from rats fed a control or a VAD diet. Equal amounts of total RNA from control or VAD kidneys were amplified by RT-PCR and separated by agarose electrophoresis. The gels were photographed and the cDNA bands were quantified by densitometry of the photo negative. The histograms represent the density of each collagen  $\alpha(IV)$  chain mRNA expressed in arbitrary units. Values are means  $\pm$  SD,  $n = 4$ . Inserts show a representative photo negative of each control and VAD cDNA. \*Different from control,  $P < 0.001$ .

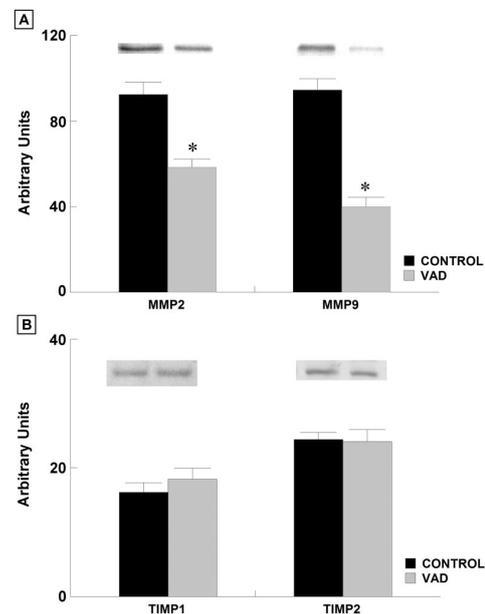
of TBM. Thickening of the BM is a pathologic and ultrastructural hallmark that precedes clinical signs in a variety of renal progressive diseases such as diabetes or Alport syndrome and is the result of an increased deposition of BM components (26,27). In renal VAD-BM, type IV collagen content was greater than in control BM. However, laminin, another major component of BM, which has been shown to increase in both diseases, did not change (data not shown). Therefore, the increase in collagen IV content appears to be the main contributor to renal VAD-BM thickening.

Interestingly, VAD did not induce a uniform change in the different collagen IV chains. The amounts of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  and  $\alpha 6(IV)$  chains were increased, whereas those of  $\alpha 2$  and  $\alpha 3(IV)$  were decreased. Differential contents of collagen IV chains were also observed in several renal pathologies. In experimental chronic serum sickness in rats, a model for immune complex-mediated nephritis, the staining intensities, as determined by immunofluorescence microscopy, for the  $\alpha 1(IV)$

chain in the mesangial matrix, and for  $\alpha 3$  and  $\alpha 4(IV)$  chains in GBM were increased 10 wk after the induction of disease. However, no change was detected either in the glomerular distribution or in the staining intensity of the  $\alpha 2(IV)$  chain (28). These 4 chains accumulated also in TBM during the course of the disease, with  $\alpha 1$  and  $\alpha 4(IV)$  having the highest levels (29). In patients with diabetic nephropathy, increments of  $\alpha 3$  and  $\alpha 4(IV)$  in the thickened GBM, but not in the mesangial matrix, and of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2(IV)$  in the expanded mesangium were also described (30).

The changes observed in the collagen chain content of VAD kidneys were likely due to modified synthesis because the steady-state mRNA levels correlated with the amounts of each protein ( $r = 0.87$ ,  $P = 0.01$ ). Accordingly, the  $\alpha 1(IV)$  and  $\alpha 4(IV)$  mRNAs were increased, whereas the  $\alpha 2(IV)$  and  $\alpha 3(IV)$  mRNAs were decreased. These results indicate that the 2 collagen chains of each pair ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$  or  $\alpha 3$ - $\alpha 4$ ) may not be coexpressed under VAD despite sharing bidirectional promoters. A similar finding was also reported in the renal tubulointerstitium during chronic serum sickness (29) in which increases at the mRNA and protein levels in  $\alpha 1(IV)$  and  $\alpha 4(IV)$  chains uncoordinated with those of  $\alpha 2(IV)$  and  $\alpha 3(IV)$  were found. The inverse change in the chains of both pairs is indicative of an abnormal collagen molecule formation. Homotrimers of  $\alpha 1(IV)$  and  $\alpha 4(IV)$  and/or unusual heterotrimers between them could be formed with the spare chains, affecting not only the structure and function of the BM but also the function of the neighboring cells. Alternatively, the surplus chains could be secreted as monomers and as such interfere with the assembly and functions of a regular BM.

The mechanism by which VAD results in changes in BM composition and particularly in collagen IV chain composition



**FIGURE 5** Quantification by Western blotting of MMPs (A) and TIMPs (B) in kidney extracts from rats fed a control or a VAD diet. Kidney detergent extracts were immunoblotted with specific antibodies and the immunoreactive protein quantified by densitometric analysis of band intensity. Histograms represent in arbitrary units the densitometric scanning of the bands. Values are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . Inserts show representative Western blots of each MMP and TIMP. \*Different from control,  $P < 0.005$ .

is not understood. Three main possibilities that may act simultaneously can be considered from what it is known. First, VAD could directly affect the expression of BM molecules through the nuclear retinoic acid receptors (RAR) or indirectly by modifying the expression of other transcription or growth factors. As far as we know, no study on the regulation of collagen IV gene expression by RARs has been done. However, several retinoic acid response elements were found in the promoter of  $\alpha 2(I)$  collagen gene. Binding of RARs to these sites inhibits the expression of the  $\alpha 2(I)$  gene but has no effect on the  $\alpha 1(I)$  gene (31). Collagen IV genes are organized in pairs and oriented head-to-head with a short promoter separating the divergent transcription units. At least 3 nuclear factors, Sp1, a CAAT-binding protein, and a CTC-binding factor, are capable of interacting specifically with the *Col4a1-Col4a2* promoter as well as with elements located downstream (32). Interestingly, it was found that RARs can interact physically with Sp1, modulate Sp1 binding to its DNA motifs and thus regulate gene transcription (33). Therefore, a direct effect of VAD on collagen IV expression may exist. On the other hand, by deactivating RARs, VAD can also upregulate the expression of other fibrogenic growth factors such as transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), which is capable of increasing the expression of at least  $\alpha 1(IV)$  collagen and other ECM proteins (34). TGF- $\beta 1$  can be expected to be raised in VAD based on the fact that retinoic acid has the ability to inhibit its expression as was described in experimental glomerulonephritis (35).

Second, the effect of VAD on BM could result from an increment in oxidative stress. VAD induces oxidative stress (14); reactive oxygen species such as oxygen peroxide or the superoxide anion activate signaling pathways, resulting in increased TGF- $\beta 1$  and collagen IV expression (36). Consistently, experimental treatments aimed to reduce oxidative stress have lowered collagen IV accumulation and attenuated renal injury (37).

Third, the effect of VAD could be the consequence of an inflammatory process. It was demonstrated that VAD exacerbates experimentally induced inflammation and that it even generates a mild inflammatory response with deposition of collagen and infiltration of inflammatory cells in the rat colon after 7 wk (11). In our model of VAD, we analyzed 2 proinflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , in kidney as markers of local inflammation. The fact that only TNF- $\alpha$  but not IL-1 $\beta$  was increased suggests that no acute inflammatory process is acting on kidney. In agreement with this suggestion, myeloperoxidase activity did not differ between control and VAD kidneys (not shown). Increased expression of TNF- $\alpha$  by renal tubular cells without inflammatory cell infiltration was described in obstructive uropathy (38). Because ligand-activated RARs are capable of suppressing TNF- $\alpha$  production (39), it is possible that VAD raises its expression by renal resident cells. Although a chronic inflammatory process cannot be completely excluded from our results, it seems more likely that the effects of VAD on renal BMs result from a decrease in retinoid activated receptors and an increase in oxidative stress. However, more work has to be done to clarify this subject especially on the differential expression of the collagen IV chains.

We also analyzed the MMPs and their endogenous inhibitors due to their role in degradation and remodeling of BMs. MMP2 and MMP9 were the focus of our study because they have activity against type IV collagen, are synthesized by different renal cell types in response to extracellular signals, and are implicated in the alterations of BMs occurring in several renal pathologies (27,40). Both MMP2 and MMP9 were decreased in kidneys of VAD rats. However, their natural

inhibitors, TIMP1 and TIMP2, did not change significantly. This effect on renal MMPs is in agreement with previous published data describing a decrease of both gelatinases in corneas of VAD rats (41). Data on the effects of retinoids on the expression of TIMPs in vivo are scarce. Some information available from patients with emphysema, however, indirectly supports our results because administration of all-*trans* retinoic acid to these patients had no substantial effect on their plasma TIMP1 levels (42). The fall in the collagenase activities without any change in the amount of the endogenous inhibitors can be an additional factor contributing to the increase in the collagen IV content of renal BMs in VAD.

Our study indicates that chronic VAD during the growing period alters the structure and composition of renal BMs, and modifies the ratio of individual collagen IV chains at both the mRNA and the protein levels. The altered BM could modify the function and the activation state of contacting cells contributing or predisposing to organ damage. In this sense, it was shown that collagen IV and laminin, normal constituents of BM, but not collagen I or fibronectin, protect mesangial cells from apoptosis, a process considered to mediate in the progression of glomerular inflammation to irreversible glomerulosclerosis (7). Although the renal functional implications of BM alterations are not completely elucidated, they are found in most of the renal pathologies analyzed at this level even before proteinuria appears. In fact, an insidious progress to plasma protein leak induced by defects in the collagen IV composition of glomerular BMs was demonstrated (43). Future work will focus on the effects of VAD on other BMs, the mechanisms mediating these effects, and its reversibility.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dra. Maria Gabaldón (Centro de Investigación, Hospital "La Fe," Valencia) for kindly and skillfully performing the whole animal perfusion and fixation.

#### LITERATURE CITED

1. Sporn, M. B., Roberts, A. B. & Goodman, D. S., eds. (1994) *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Raven Press, New York, NY.
2. Lelièvre-Pégurier, M., Vilar, J., Ferrier, M. L., Moreau, E., Freund, N., Gilbert, T. & Merlet-Bénichou, C. (1998) Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int.* 54: 1455-1462.
3. Wagner, J. (2001) Potential role of retinoids in the therapy of renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16: 441-444.
4. Müller, U. & Brändli, A. W. (1999) Cell adhesion molecules and extracellular-matrix constituents in kidney development and disease. *J. Cell Sci.* 112: 3855-3867.
5. Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M. & Neilson, E. G. (2003) Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome and type IV collagen. *N. Engl. J. Med.* 348: 2543-2556.
6. Miner, J. H. & Sanes, J. R. (1996) Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen  $\alpha 3(IV)$ : implications for Alport syndrome. *J. Cell Biol.* 135: 1403-1413.
7. Mooney, A., Jackson, K., Bacon, R., Strenli, C., Edwards, G., Bassuk, J. & Savill, J. (1999) Type IV collagen and laminin regulate glomerular mesangial cell susceptibility to apoptosis via  $\beta 1$ , integrin-mediated survival signals. *Am. J. Pathol.* 155: 599-606.
8. Boylan, J. F., Lohnes, D., Taneja, R., Chambon, P. & Gudas, L. J. (1993) Loss of retinoic acid receptor gamma function in F9 cells by gene disruption results in aberrant Hoxa-1 expression and differentiation upon retinoic acid treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 9601-9605.
9. Taub, M. (1991) Retinoic acid inhibits basement membrane protein biosynthesis while stimulating dome formation by Madin Darby canine kidney cells in hormonally defined serum-free medium. *J. Cell. Physiol.* 148: 211-219.
10. Traianedes, K., Ng, K. W., Martin, T. J. & Findlay, D. M. (1993) Cell substratum modulates responses of preosteoblasts to retinoic acid. *J. Cell. Physiol.* 157: 243-252.
11. Reifen, R., Nur, T., Ghebermeskel, K., Zaiger, G., Urizky, R. & Pines, M. (2002) Vitamin A deficiency exacerbates inflammation in a rat model of colitis through activation of nuclear factor- $\kappa B$  and collagen formation. *J. Nutr.* 132: 2743-2747.
12. Fisher, G. J. & Voorhes, J. J. (1996) Molecular mechanisms of retinoid action in skin. *FASEB J.* 10: 1002-1013.

13. Sado, Y., Kagawa, M., Kishiro, Y., Sugihara, K., Naito, I., Seyer, J. M., Sugimoto, M., Oohashi, T. & Ninomiya, Y. (1995) Establishment by the rat lymph node method of epitope-defined monoclonal antibodies recognizing the six different  $\alpha$  chains of human type IV collagen. *Histochem. Cell Biol.* 104: 267–275.
14. Barber, T., Borrás, E., Torres, L., García, C., Cabezuelo, F., Lloret, A., Pallardó, F. V. & Viña, J. R. (2000) Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 1–7.
15. Estornell, E., Tormo, J. R., Marín, P., Renau-Piqueras, J., Timoneda, J. & Barber, T. (2000) Effects of vitamin A deficiency on mitochondrial function in rat liver and heart. *Br. J. Nutr.* 84: 927–934.
16. Williams, M. (1977) Stereological techniques. In: *Practical Methods in Electron Microscopy* (Glauert, A. M., ed.), vol. 6, pp. 1–225. North Holland/American Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.
17. Renau-Piqueras, J., Guasch, R., Azorín, I., Seguí, J. M. & Gueri, C. (1977) Prenatal alcohol exposure affects galactosyltransferase activity and glycoconjugates in the Golgi apparatus of fetal rat lipocytes. *Hepatology* 25: 343–350.
18. Arnaud, J., Fortis, I., Blachier, S., Kia, D. & Favier, A. (1991) Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 572: 103–116.
19. Podda, M., Weber, C., Traber, M. G., Milbradt, R. & Packer, L. (1999) Sensitive high-performance liquid chromatography techniques for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols, ubiquinolins and ubiquinones in biological samples. *Methods Enzymol.* 299: 330–341.
20. Barua, A. B. & Olson, J. A. (1998) Reversed-phase gradient high-performance chromatographic procedure for simultaneous analysis of very polar to nonpolar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 707: 67–79.
21. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227: 680–685.
22. Miner, J. H. & Sanes, J. R. (1994) Collagen IV  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , and  $\alpha 5$  chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J. Cell Biol.* 127: 879–891.
23. Ryan, J. J., Katbamna, I., Mason, P. J., Pusey, C. D. & Turner, A. N. (1998) Sequence analysis of the 'Goodpasture antigen' of mammals. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13: 602–607.
24. Oohashi, T., Sugimoto, M., Mattei, M. G. & Ninomiya, Y. (1994) Identification of a new collagen IV chain, alpha 6(IV), by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5. *J. Biol. Chem.* 269: 7520–7526.
25. Hayat, M. A. (1992) Quantitation of immunogold labelling. *Micron* 23: 1–16.
26. Noel, L. H. (2000) Renal pathology and ultrastructural findings in Alport's syndrome. *Renal Fail.* 22: 751–758.
27. Tsilibary, E. C. (2003) Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J. Pathol.* 200: 537–546.
28. Bergijk, E. C., Van Alderwegen, I. E., Baelde, H. J., De Heer, E., Funabiki, K., Miyai, H., Killen, P. D., Kalluri, R. K. & Bruijn, J. A. (1998) Differential expression of collagen IV isoforms in experimental glomerulosclerosis. *J. Pathol.* 184: 307–315.
29. Van Vliet, A., Van Alderwegen, I. E., Baelde, H. J., De Heer, E., Killen, P. D., Kalluri, R. K., Bruijn, J. A. & Bergijk, E. C. (1999) Differential expression of collagen type IV alpha-chains in the tubulointerstitial compartment in experimental chronic serum sickness nephritis. *J. Pathol.* 189: 279–287.
30. Yagame, M., Kim, Y., Zhu, D., Suzuki, D., Eguchi, K., Nomoto, Y., Sakai, H., Groppoli, T., Steffes, M. W. & Mauer, S. M. (1995) Differential distribution of type IV collagen chains in patients with diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephron* 70: 42–48.
31. Wang, L., Tankersley, L. R., Tang, M., Potter, J. J. & Mezey, E. (2002) Regulation of the murine  $\alpha 2(I)$  collagen promoter by retinoic acid and retinoid X receptors. *Arch. Biochem. Biophys.* 401: 262–270.
32. Pollner, R., Schmidt, C., Fisher, G., Kühn, K. & Pöschl, E. (1997) Co-operative and competitive interaction of regulatory elements are involved in the control of divergent transcription of human COL4A1 and COL4A2 genes. *FEBS Lett.* 405: 31–36.
33. Shimada, J., Suzuki, Y., Kim, S. J., Wang, P. C., Matsumura, M. & Kojima, S. (2001) Transactivation via RAR/RXR-Sp1 interaction: characterization of binding between Sp1 and GC box motif. *Mol. Endocrinol.* 15: 1677–1692.
34. Douthwaite, J. A., Johnson, T. S., Haylor, J. L., Watson, P. & El Nahas, A. M. (1999) Effects of transforming growth factor- $\beta 1$  on renal extracellular matrix components and their regulating proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 2109–2119.
35. Morath, C., Dechow, C., Lehrke, I., Haxsen, V., Waldherr, R., Floege, J., Ritz, E. & Wagner, J. (2001) Effects of retinoids on the TGF- $\beta$  system and extracellular matrix in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 2300–2309.
36. Iglesias-De la Cruz, M. C., Ruiz-Torres, P., Alcamí, J., Diez-Marques, L., Ortega-Velazquez, R., Chen, S., Rodríguez-Puyol, M., Ziyadeh, F. N. and Rodríguez-Puyol, D. (2001) Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF- $\beta$  in human mesangial cells. *Kidney Int.* 59: 87–95.
37. De Rubertis, F. R., Craven, P. A., Melhem, M. F. & Salah, E. M. (2004) Attenuation of renal injury in db/db mice overexpressing superoxide dismutase: evidence for reduced superoxide-nitric oxide interaction. *Diabetes* 53: 762–768.
38. Misseri, R., Meldrum, D. R., Dagher, P., Hile, K., Rink, R. C. & Meldrum, K. K. (2004) Unilateral ureteral obstruction induces renal tubular cell production of tumor necrosis factor- $\alpha$  independent of inflammatory cell infiltration. *J. Urol.* 172: 1595–1599.
39. Mou, L., Lankford-Turner, P., Leander, M. V., Bissonnette, R. P., Donahoe, R. M. & Royal, W. (2004) RXR induced TNF- $\alpha$  suppression is reversed by morphine in activated U937 cells. *J. Neuroimmunol.* 147: 99–105.
40. Camp, T. M., Smiley, L. M., Hayden, M. R. & Tyagi, S. C. (2003) Mechanism of matrix accumulation and glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 21: 1719–1727.
41. Twining, S. S., Schulte, D. P., Zhou, X., Wilson, P. M., Fish, B. L. & Moulder, J. E. (1997) Changes in rat corneal matrix metalloproteinases and serine proteinases under vitamin A deficiency. *Curr. Eye Res.* 16: 158–165.
42. Mao, J. T., Tashkin, D. P., Belloni, P. N., Baileyhealy, I., Baratelli, F. & Roth, M. D. (2003) All-trans retinoic acid modulates the balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with emphysema. *Chest* 124: 1724–1732.
43. Hamano, Y., Grunkemeyer, J. A., Sudhakar, A., Zeisberg, M., Cosgrove, D., Morello, R., Lee, B., Sugimoto, H. & Kalluri, R. (2002) Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus. *J. Biol. Chem.* 277: 31154–31162.