

Expresión de metaloproteínas y sus inhibidores de tejido en un modelo murino de fibrosis pulmonar

Claudia Maritza Bárcenas Cuadros, MSc *

Luz Elena Cano, PhD **

Ana María Coock, MD *

Adriana Martínez Pérez, MD **

Angela Restrepo Molina, PhD *

Resumen

Antecedentes: La paracoccidiodomicosis es una micosis profunda que se caracteriza por inflamación granulomatosa crónica que progresa a fibrosis pulmonar como resultado de falta de balance entre la síntesis y degradación de la matriz extracelular, pero los mecanismos implicados no se entienden claramente.

Objetivo: Determinar en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducido por *P. brasiliensis*, la expresión de colagenasa intersticial (MMP-1), gelatinasa A (MMP-2) y TIMP-1. **Métodos:** Tejido pulmonar obtenido por biopsia de 15 ratones BALB/c infectados con *P. brasiliensis* y ocho inoculados con solución salina se estudiaron a las semanas 1, 4, 8, 12 y 16 post-infección. **Resultados:** A las 4 semanas del inóculo el 85,7% de los ratones tenían marcación para MMP-1 y MMP-2, y en el 71,4% para TIMP-1, todos de intensidad moderada en células epiteliales de los alveolos, macrófagos alveolares y células de músculo liso alrededor de bronquiolos y vasos sanguíneos. A las 16 semanas en la gran mayoría de biopsias se observó una tinción moderada para estas metaloproteinasas, aunque de mayor intensidad en la tercera parte de las muestras; la localización de estuvo en células epiteliales y macrófagos alveolares. **Conclusión:** A mayor depósito de colágeno hay mayor desbalance de las metaloproteínas y sus inhibidores de tejidos, teniendo como patrón la producción y depósito secundario a una respuesta inflamatoria. Los macrófagos alveolares y las células intersticiales alveolares son las principales fuentes celulares de producción de MMP-1, MMP-2 y TIMP-1. [Bárcenas CM, Cano LE, Coock AM, Martínez A, Restrepo A. Expresión de metaloproteínas y sus inhibidores de tejido en un modelo murino de fibrosis pulmonar. MedUNAB 2004; 7: 9-14]

Palabras clave: Fibrosis pulmonar, Paracoccidiodomicosis, matriz extracelular, metaloproteína 1, metaloproteína 2, Inhibidor de tejido de metaloproteína 1.

Introducción

La paracoccidiodomicosis (PCM) es una micosis profunda de curso subagudo o crónico, cuyo agente etiológico es el hongo dimorfo *Paracoccidioides brasiliensis*, que compromete varios órganos y sistemas con predominio de los pulmones.^{1, 2} Histológicamente se caracteriza por la presencia de inflamación granulomatosa crónica que progresa a fibrosis pulmonar, la cual se observa como secuela en el 60-80% de los pacientes.³

La enfermedad ha sido reproducida en algunos modelos animales, los cuales desarrollan cambios morfológicos similares a la enfermedad humana.^{4, 5} La inhalación de conidias induce a una inflamación granulomatosa caracterizada por el acumulo de macrófagos y linfocitos. La reacción inflamatoria es seguida por una respuesta fibrótica con proliferación de fibroblastos y una excesiva acumulación de los componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágeno intersticial y elastina insoluble.

Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos que conducen a la organización de las células inflamatorias dentro del granuloma producido en la PCM y de los mecanismos responsables de las alteraciones patológicas que conducen a una respuesta fibrótica. En modelos experimentales de esta micosis se ha demostrado un aumento de varias citoquinas, tales como IFN γ , TNF α , IL-4 y TGF β , las cuales están asociadas con la producción de granulomas y el desarrollo de fibrosis.⁶

El remodelamiento de la matriz extracelular normal depende de un balance de los patrones de síntesis/degradación.⁷

La degradación de la matriz extracelular es un complejo proceso de multifases que involucra una familia de endopeptidasas dependientes del zinc, conocidas como metaloproteinasas de la matriz (MMPs). MMPs son un número de enzimas estructuralmente relacionadas capaz de digerir

* Fundación Cardiovascular de Colombia, Bucaramanga, Colombia.

** Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Dra. Claudia Maritza Bárcenas, Fundación Cardiovascular de Colombia, Calle 155A # 23-58, Urbanización El Bosque, sector E-1, Bucaramanga, Colombia. E-mail: jrbarcenas@hotmail.com

Artículo recibido: 26 de febrero de 2004; aceptado abril 12 de 2004.

la matriz extracelular y los componentes de la membrana basal.⁸ Teniendo en cuenta el dominio de la estructura y la afinidad al sustrato, se dividió en cuatro grupos mayores: colagenasas, estromelinas, gelatinasas y metaloproteinasas tipo membrana. La colagenasas (MMP-1, MMP-8, y MMP-13) degrada principalmente colágeno fibrilar, tipo I, II, III y X; las estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11, y MMP-20) digieren los proteoglicanos y algunas glicoproteínas; las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) tienen una afinidad por la membrana basal (colágeno tipo IV), colágeno desnaturalizado (gelatina), elastina y fibronectina. MMP-7 y MMP-12 tiene afinidad similar a las gelatinasas, dividen la fibronectina, laminina, elastina y los proteoglicanos. Las metaloproteinasas tipo membrana (MT1, MT2, MT3 y MT4-MMPS) tiene una afinidad de sustrato amplia, incluyendo la activación de progelatinasa A. La actividad de MMP es regulada en diferentes niveles, incluyendo control en la transcripción, activación extracelular de proenzimas, inhibición de enzimas activas.⁷

La estricta regulación de la actividad de MMP es necesaria para mantener la homeostasis de los tejidos como también el efecto de remodelación de los tejidos. Las MMPs es inducida por factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias, interacciones célula-matrix, e interacciones célula-célula. Las MMPs e inhibida por TGF β , ácido retinoico y glucocorticoides. Un nivel adicional de regulación de MMPs es por los inhibidores de metaloproteinasas α 2-macroglobulinas y los inhibidores de tejido de metaloproteinasas (TIMP), las cuales bloquean la actividad proteolítica de MMPs.⁹

Los TIMPs son los principales reguladores endógenos de la actividad de MMP en el microambiente de los tejidos. Cuatro TIMPs homólogos ha sido caracterizados: TIMP-1, -2, -3, y -4. Los TIMPs, además de inhibir las MMPs, tienen la capacidad de estimular la proliferación celular, inducción o inhibición de la apoptosis, y la inducción de la expresión de MMPs *in vitro*.⁹

Durante la fibrosis hay un progresivo depósito de colágeno, por lo que se planteó conocer si existe diferencia en el balance MMPs/TIMPs entre la fase inflamatoria y la fase fibrótica en la paracoccidiodomicosis.

Materiales y métodos

A partir de biopsias pulmonares obtenidas de ratones BALB/c machos que presentaban fibrosis pulmonar inducida por la inoculación intranasal de tres millones de conidias de *P. brasiliensis*, se hicieron cortes de 4 micras en los cuales se realizó inmunohistoquímica y las diferentes coloraciones para el estudio histopatológico. Este modelo está conformado por diferentes tiempos de observación post-infección (1, 4, 8, 12, 14 y 16 semanas).

Debido a que el presente estudio se realizó en bloques pulmonares de un modelo experimental anterior, solo en 15

Tabla 1. Distribución en grupos de los ratones BALB/c del modelo experimental de fibrosis pulmonar Inducida por inhalación de conidias de *P. brasiliensis*

GrupoNo.	Número de ratones BALB/c	
	Infectados	Controles (sanos)
Grupo I	7	4
Grupo II	8	4

ratones infectados de diferentes tiempos se pudo demostrar la presencia de MMP-1, MMP-2, TIMP-1 y colágeno, así como en 10 de los ratones control inoculados de la misma forma con solución salina. Para obtener este modelo se utilizaron técnicas de obtención y mantenimiento de la cepa *P. brasiliensis*, preparación de inóculo, infección intranasal y sacrificio de ratones publicados en otra parte.¹⁰

Teniendo en cuenta que los procesos fibróticos se presentan a partir de la octava semana post-infección, las muestras procesadas se dividieron en dos grupos, grupo 1 (semana 1 y semana 4), y grupo 2 (semanas 8, 12 y 16). Los grupos quedaron conformados de acuerdo a la relación presentada en la tabla 1.

Evaluación histopatológica. A partir de las biopsias pulmonares incluidas en parafina, se realizaron cortes de 4 micras de espesor, los que fueron tunturados con hematoxilina-eosina (HE) (Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri) para determinar los patrones celulares y la presencia de lesiones inflamatorias o granulomatosas, y con tricrómico de Masson's (Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri), para identificar la presencia de las fibras de colágeno tipo I.

Inmunohistoquímica. La colagenasa 1 (MMP-1), gelatinasa A o colagenasa IV (MMP-2) y el inhibidor de metaloproteinasas 1 (TIMP-1) fueron analizados con anticuerpos primarios policlonales.

A partir del tejido pulmonar incluido en parafina, se realizaron cortes de 4 micras de espesor. Estos cortes pulmonares fueron sometidos a procesos de desparafinada y rehidratación antes de realizar la inmunotinción. Antes de la reacción inmune los epitopes antigénicos fueron desmascarados con 0.1 mol/L de buffer citrato de sodio, pH 6.0.

Los anticuerpos primarios MMP-1, MMP-2, TIMP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA.), en concentraciones de 10 μ g/ml (dilución 1:20) fueron aplicadas e incubadas a temperatura ambiente durante una hora. La incubación con anticuerpo secundario biotilado (antigoat IgG biotilado; Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA) se realizó a una dilución de 1:200 durante una hora; posteriormente se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (avidina-biotina gota ABC staining system; Vectastina ABC, Vec-

Tabla 2. Parámetros para la evaluación del depósito de MMP-1, MMP-2, TIMP-1 en los pulmones de ratones BALB/c infectados con conidias de *P. brasiliensis*

Escala de valores	Cambios en el depósito de fibras de colágeno III	Cambios en el depósito de MMP-1, MMP-2, TIMP-1
1	Presencia de fibras de colágeno, iguales a los depósitos normales.	Presencia escasa (menos del 20%) de células con inmunotinción de baja intensidad en el color.
2	Presencia de fibras delgadas.	Presencia moderada (entre 21-50%) de células con inmunotinción de intensidad moderada en el color.
3	Presencia de fibras gruesas.	Presencia abundante (mayor 50%) de células con inmunotinción gran intensidad en el color.

Tabla 3. Porcentaje de área pulmonar comprometida e índice de infiltrado

Grupo de infección	% compromiso pulmonar	Índice de infiltrado inflamatorio*		
		Macrófagos	Linfocitos	PMN
Grupo I	28,5%	10,68%	7,45%	4,27%
Grupo II	54,4%	32,91%	14,86%	10,93%

*Se determinó según la fórmula descrita en materiales y métodos; este infiltrado inflamatorio presentaba una distribución en parches.

tor Laboratorios) durante treinta minutos a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa fue visualizada con 3-amino 9-ethylcarbazole como sustrato (Diaminobenzidina líquida K-3466, Dako Corporation, CA). Los controles negativos fueron procesados e incubados con suero no inmune. Todos los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina de Mayer (Sigma Chemical Company, St Louis, MI) durante dos minutos.

Sistema de análisis de datos. En los cortes pulmonares coloreados con hematoxilina-eosina se evaluó el compromiso pulmonar y el infiltrado celular. El compromiso pulmonar se evaluó con base en una escala de 0-100%, donde 100% se refiere a pérdida total de la arquitectura normal en toda la extensión del pulmón.

Para determinar el porcentaje de infiltrado pulmonar, se tuvo en cuenta el porcentaje de los diferentes tipos de células con respecto a la totalidad de células inflamatorias, así como el porcentaje de compromiso pulmonar con respecto al área total pulmonar. De esta forma se determinó el índice de infiltrado celular a nivel pulmonar.

Los cambios en el depósito de MMP-1, MMP-2, TIMP-1 se determinaron semicuantitativamente sobre una escala de valores que oscila entre 1 y 3 de acuerdo a la ausencia o presencia e intensidad de los depósitos pericelular (tabla 1).

Los cambios en el depósito de colágeno se determinaron semicuantitativamente sobre una escala de valores que oscila entre 1 y 3, de acuerdo a la ausencia o presencia de fibras delgadas o gruesas (tabla 2).

Resultados

Histopatología. Como se ha demostrado en los modelos experimentales anteriores, los pulmones de los ratones BALB/c infectados con conidias de *P. brasiliensis*, presentaron alteraciones en la arquitectura pulmonar y, a partir de la semana 8 post-infección, desarrollaron fibrosis con una distribución a parche. Ninguno de los ocho controles sanos del modelo experimental que habían recibido solución salina presentaron cambios inflamatorios o fibróticos a nivel pulmonar.

En todos los ratones infectados del grupo 1 (semana 1-4 post-infección) se observó compromiso pulmonar leve (28,5%), con escasos focos inflamatorios (figura 1); adicionalmente, se evidenció un leve incremento de las diferentes células inflamatorias (polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos), pero no se observó predominio de ninguna línea celular. En el grupo 2 se observó un mayor compromiso de la arquitectura pulmonar (54,4%), evidenciándose cambios inflamatorios y alteraciones del parenquima pulmonar. En el infiltrado celular se observó predominio de macrófagos (32,91%). El grado de compromiso pulmonar y su cambio, a través del tiempo post-infección se puede resumir en la tabla 3.

En el grupo 1 la gran mayoría de biopsias (85,7%) mostraron una coloración moderada de MMP-1, MMP-2. Para el TIMP-1 se observó una inmunotinción moderada en el 71.4% de las biopsias. La marcación se observó en células epiteliales del septum alveolar, macrófagos alveolares y células de músculo liso alrededor de bronquios y vasos sanguíneos.

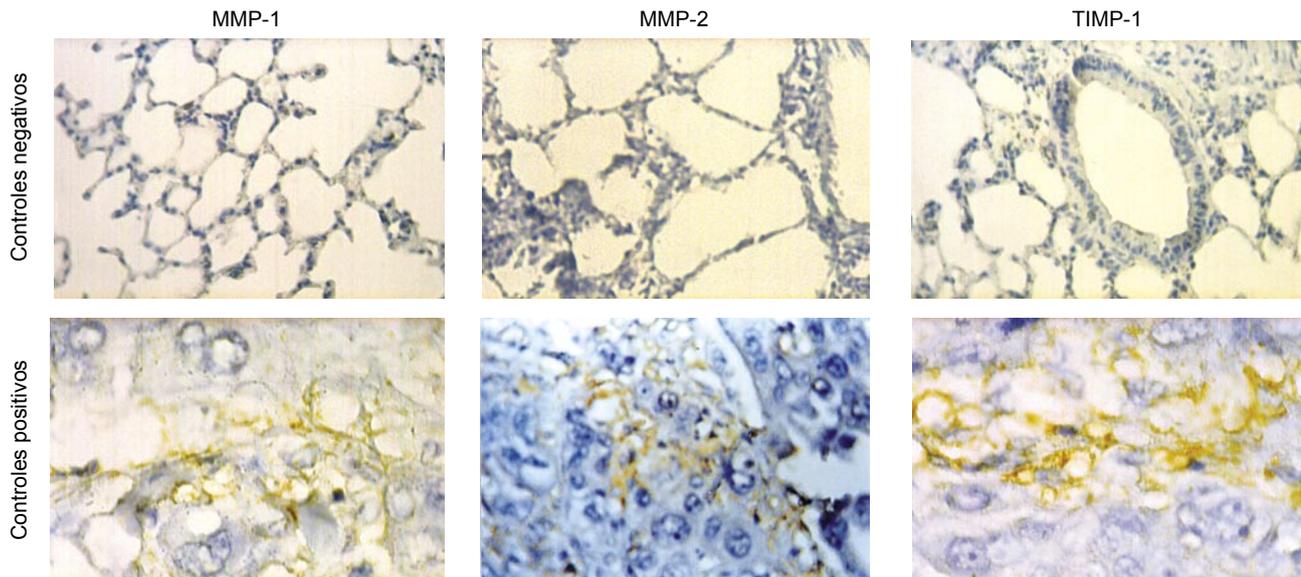


Figura 1. Controles negativos y controles positivos

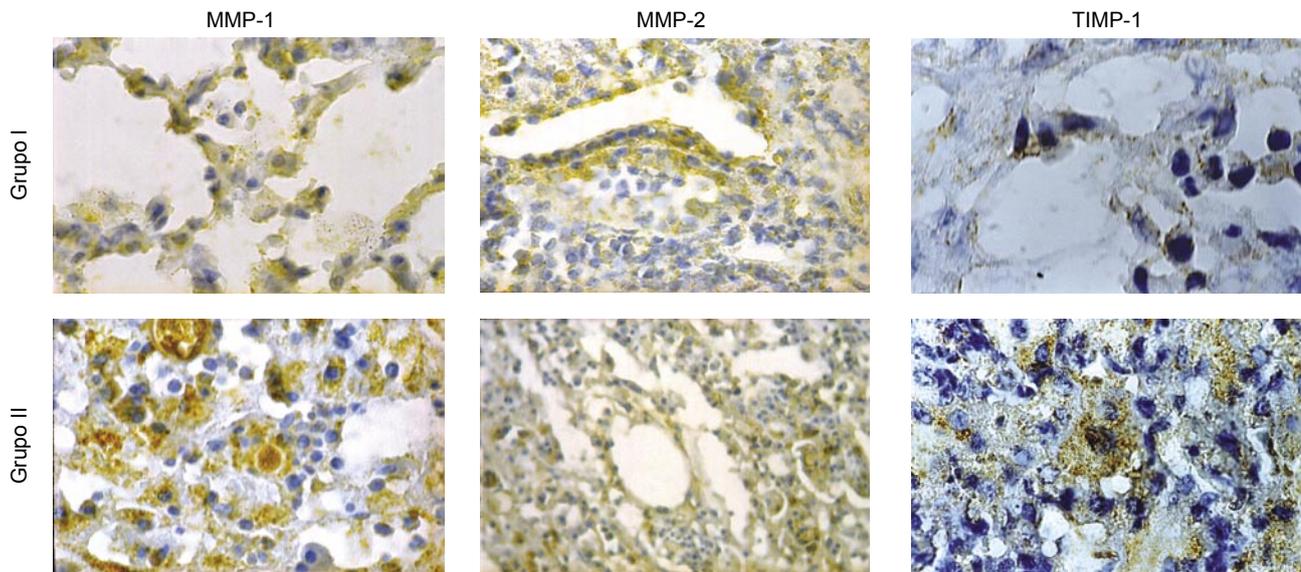


Figura 2. Expresión MMP-1, MMP-2 y TIMP-1 en el grupo I y II post-infección

En el grupo 2 también en la gran mayoría de biopsias se observó una señal de intensidad moderada para MMP-1 y MMP-2, pero a diferencia del grupo 1, un mayor porcentaje de biopsias (37,5%) reveló una coloración intensa para las metaloproteinasas analizadas. De igual manera en comparación con el grupo 1, un mayor porcentaje de biopsias (37,2% vs 28,5%) mostraron una inmunotinción intensa para TIMP-1. Los animales tratados con solución salina (controles sanos) no mostraron inmunotinción para ninguna de la metaloproteinasas, ni para el TIMP-1 en el parénquima pulmonar.

La inmunohistoquímica confirmó la presencia de numerosos macrófagos productores de colagenasas en áreas peribronquiales y lesiones granulomatosas (figura 2).

Los cambios en los depósitos de MMP, TIMP-1 y colágeno III, a través del tiempo de observación experimental, se resumen en la tabla 4.

En el grupo I solo el 28,5% de las biopsias pulmonares mostró presencia de fibras delgadas de colágeno tipo III, las cuales se localizaban en los focos inflamatorios. En el grupo II, el 62,5% de las biopsias analizadas presentaban depósito de fibras gruesas de colágeno tipo III, las que ocasionalmente formaban bandas alrededor de fibroblasto y macrófagos.

Al asociar el comportamiento de los depósitos de colágeno con los depósitos de MMP-1, MMP-2 y TIMP-1, se observó que estos eran directamente proporcionales, de tal forma

Tabla 4. Depósito de MMP-1, MMP-2, TIMP-1 y colágeno

Tinción		Grupo*	
		I (n = 7)	II (n = 8)
Tricrómico	1	5	
	2	2	2
	3		5
MMP-1	1		
	2	6	5
	3	1	8
MMP-2	1		
	2	6	5
	3	1	3
TIMP-1	1		
	2	5	5
	3	2	3

*Los datos se expresaron como número de ratones con depósito de fibras delgadas o gruesas del total de cada grupo

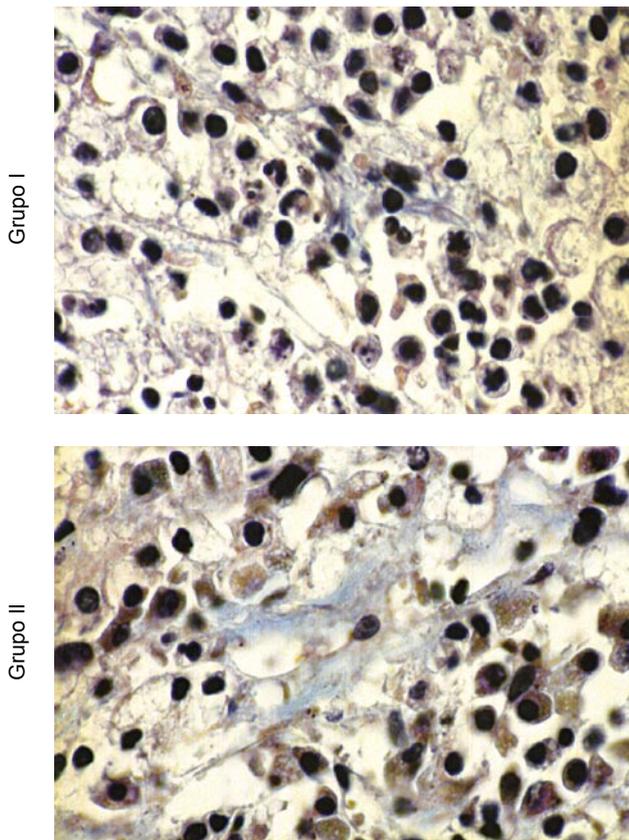


Figura 3. Expresión de fibras de colágeno en el grupo I y II post-infección

que a mayor presencia de colágeno se observó mayor intensidad en la inmunotinción de la metaloproteinasas (MMP-1 y MMP- 2) y su inhibidor (TIMP-1), tal como se ven en la figura 3.

Discusión

Los mecanismos patogénicos responsables de la acumulación progresiva del colágeno dentro de los granulomas de paracoccidiodomicosis no han sido totalmente elucidados. Algunas citoquinas fibrogénicas han sido implicadas en este proceso como se ha demostrado en anteriores modelos experimentales. *In vitro* el TGF β , IFN γ y las interleuquinas IL-1 y IL-6 contribuyen a la formación de fibrosis.⁶ Coincidentalmente, numerosos estudios han mostrado que ambas citoquinas regulan la expresión de MMPs y TIMPs. TNF- α induce la gelatinasa B y collagenasa, y tiene un efecto bifuncional sobre la producción TIMP-1, la estimula en concentraciones bajas y la inhibe en concentraciones altas. El TGF- α aumenta la producción de TIMP-1, inhibe la expresión de collagenasa 1.¹¹

En la paracoccidiodomicosis se desconoce los mecanismos de regulación que ejercen las metaloproteinasas y sus inhibidores. En el presente estudio examinamos la expresión de MMP-1 (colagenasa intersticial), MMP-2 (gelatinasa A) y TIMP-1 durante la progresión de la paracoccidiodomicosis. Nuestros resultados muestran una expresión moderada de las MMP-1,-2 y TIMP-1 en el grupo I (semana 1 y 4 post-infección). La tinción se observó en las células epiteliales de los alveolos, en las colecciones de macrófagos situados en los alveolos y en el tejido intersticial alrededor de los bronquiolos respiratorios. La expresión de las MMPs analizadas fue menor, pero en mayor intensidad en el grupo II. El TIMPs se expresó en mayor cantidad y mayor intensidad. La células que más se asociaron a la expresión de esta metaloproteinas fueron los macrófagos.

En modelos experimentales de fibrosis pulmonar inducida por sílice se demostró que en estadio temprano del granuloma la expresión de collagenasa 3, gelatinasa A y gelatinasa B era marcada, la cual se observó en el interior de los granulomas y los macrófagos localizados a nivel alveolar y peribronquial. En los granulomas fibróticos la expresión de MMPs decreció, demostrándose una alteración de la actividad de las metaloproteinasas.^{7, 12}

De igual manera el líquido del lavado bronqueoalveolar de pacientes con sarcoidosis se demostró un incremento en la actividad gelatinolítica, principalmente de la gelatinasa B que esta gelatinasa juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.¹³ En humanos con neumonía intersticial aguda, bronquiolitis obliterante se demostró un incremento de los TIMPs los cuales inhiben la neovascularización y aumentaban los depósitos de matriz extracelular.¹⁴

En conclusión, al igual que en otros modelos experimentales de fibrosis pulmonar y paciente con alteraciones fi-

bróticas, en el modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por conidias de *P. brasiliensis*, se demostró que las metaloproteinasas y sus inhibidores juegan un papel importante en los mecanismos de remodelación pulmonar, ya que ellas no se expresaron en los pulmones de los ratones control.

Desafortunadamente en el presente estudio solo realizó técnicas de inmunohistoquímica, la cual nos sirve para demostrar la presencia de estas moléculas en el proceso fibrótico, pero con esta técnica no se puede cuantificar estas enzimas para demostrar un verdadero desbalance de ellas. Es necesario realizar posteriores estudios para determinar la cantidad y la actividad enzimática de las metaloproteinasas y sus inhibidores, en la fibrosis pulmonar inducida por *P. brasiliensis*.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Colciencias (Código 3311 - 907 -98). Nuestra más sentida gratitud al Grupo de Micología Médica de la Corporación de Investigaciones Biológicas por toda su colaboración.

Summary:

Metalloprotein expression and its tissue inhibitors in a murine model with pulmonary fibrosis. Background: Paracoccidioidomycosis is a deep mycosis, characterized by a chronic granulomatous inflammation. It progresses into a pulmonary fibrosis as a result of lack of balance between the synthesis and the degrading of the extracellular matrix. However, its mechanisms are not, yet, clearly understood. Objective: To determine through a *P. brasiliensis* induced murine model with pulmonary fibrosis, the expression of interstitial collagenase (MMP-1), gelatinase A (MMP-2) and TIMP-1. Methods: 15 infected with *P. brasiliensis* and 8 control BALBB/c mice were lung biopsied 1, 4, 8, 12 y 16 postinfection. Results: 4 weeks follow inoculation 85,7% infected mice expressed MMP-1 and MMP-2, and 71.4% to TIMP-1, all with moderate intensity in alveolar macrophages, and in peribronchial and blood vessels smooth muscle cells. 16 weeks postinfection near all infected biopsies showed moderate staining to metalloproteinasas, but with more high intensity in 30% samples, specially in epithelial and macrophagic cells. Conclusion: To more collagen depot, there are more metalloproteinasas and their tissue inhibitors, with a inflammatory pattern in production and depot. Alveolar

macrophages and interstitial cells are the principal MMP-1, MMP-2 and TIMP-1 production sources.

Key words: Pulmonary fibrosis, Paracoccidioidomycosis, extracellular matrix, metalloproteinase-1, metalloproteinase-2, Metalloproteinase-1 tissue inhibitor.

Referencias

1. Emonard H, Grimoud JA. Matriz metaloproteinasas. A review. *Cel Mol Biol* 1990; 36:131-53.
2. Brummer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis an update. *Clin Microb Rev* 1993; 6:89-117.
3. Brito T, Franco MF. Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1994; 36:185-92.
4. McEwen JG, Bedoya V, Patiño ME, Salazar M, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycology* 1987; 25:165-75.
5. Restrepo S, Tobón AM, Restrepo A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *J Med Vet Mycol* 1992; 30:173-84.
6. Franco L, Najvar L, Gómez B, Restrepo S, Restrepo A, Graybill JR. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: Measurement of the host local responses. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58:424-30.
7. Perez-Ramos J, Segura ML, Vanda B, Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care* 1999; 160:1274-82.
8. Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci* 1994; 732:11-21.
9. Madtes DK, Elston AL, Clark JG. Selective induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:599-607.
10. Restrepo BI, McEwen JG, Salazar ME, Restrepo A. Morphogenesis of the conidia produced by *P. brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol* 1986; 24:337-9.
11. Santana A, Saxena B, Noble NA, Gold LI, Marshall BC. Increased expression of transforming growth factor B isoforms (b1, b2, b3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13:34-44.
12. Obayashi Y, Yamadori I, Fujita J, Yoshinouchi T, Ueda N, Takahara J. The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1997; 112:1338-44.
13. Roman J, Leon YJ, Gal A, Perez RL. Distribution of extracellular matrices, matrix receptors, and transforming growth factor-B1 in human and experimental lung granulomatous inflammation. *Am J Med Sci* 1995; 309:124-33.
14. Fukuda Y, Mochimaru H, Kudoh, S. Mechanism of structural remodeling in pulmonary fibrosis. *Chest* 120:41S-43S.