



00346
6
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PRODUCCION AUTOCRINA DE FACTOR DE
CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS
POR FIBROBLASTOS DERIVADOS DE
PULMON NORMAL Y CON FIBROSIS
IDIOPATICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**

P R E S E N T A

LUZ MARIA ROJAS VALENCIA

**DIRECTORES DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO SEMO
M. EN C. MOISES EDUARDO SELMAN LAMA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

00346
6
29



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA DE
INVESTIGACIONES QUÍMICAS DE POST GRADO

INDUCCIÓN AUTOCRINA DE FACTOR DE
CROUZFIELD-JACOBSON DERIVADO DE PLAQUETAS
POR LAS CÉLULAS MDS DERIVADOS DE
LA LEUCEMIA MDS CON RECEPTOR
OLIGOPÉPTICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

DE BIOLOGÍA CELULAR

PRESENTA

LUZ MARIA ROJAS VALENTE

**A TEODORA VALENCIA
Y JOSE AGUILAR LUNA**

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Annie Pardo Semo tutora de la tesis, por su confianza y apoyo en la realización de la presente, así como por su admirable ejemplo como investigadora, profesora y mujer.

Al doctor Moises Selman co-tutor de la tesis, por su invaluable ayuda teórica así como por el suministro de las diversas líneas celulares probadas en este estudio.

Al doctor Fernando Montiel por su múltiple ayuda en el desarrollo de la tesis y por su amistad.

Al doctor Alfonso Torre Blanca por lo preciso y conciso tanto de sus críticas como de sus sugerencias a lo largo del desarrollo experimental.

A la M. en E. Rosario Priego Martínez por su valiosa cooperación en la parte estadística del presente manuscrito.

A Julia, Mary Carmen, Laura y Remedios, integrantes del laboratorio de Bioquímica, por sus ayuda múltiple durante el desarrollo de la tesis.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo financiero para el desarrollo experimental de la tesis (No. de Proyecto IN-200691) y por la beca que me fue otorgada para la preparación del presente manuscrito.

**"puede que nadie llegue a decir
la verdad en la tierra..."**

Ms. Cantares Mexicanos, fol. 13r.

RESUMEN

Se cree que la replicación de fibroblastos de pulmón está controlada por factores de crecimiento exógenos, secretados principalmente por macrófagos y células epiteliales. Sin embargo, en condiciones de cultivo, los fibroblastos de pulmón son capaces de producir varios factores de crecimiento sugiriendo una ruta autócrina de proliferación.

La síntesis de factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena A (FCDP-A) ha sido mostrada en los fibroblastos de pulmón de rata, pero no ha sido demostrada la presencia de FCDP-A o FCDP-B en fibroblastos de pulmón humano. En el transcurso de un experimento con el medio condicionado (MC), obtenido de fibroblastos de pulmón derivados de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), fue observada actividad semejante al FCDP sobre las células blanco BALB/c3T3. Para explorar este hecho, fue examinada la expresión del mensajero del FCDP-B por los fibroblastos obtenidos de 4 líneas celulares de pulmón normal y de 4 con FPI.

El análisis con la hibridación de tipo Northern mostró que los fibroblastos derivados de FPI y normales, expresaron el mensajero de 2.8 kb. Este mensajero fue observado como una banda menor en una línea de osteosarcoma humano, utilizada como control positivo (U2-OS), la cual predominantemente expresa el mensajero de 4 kb del FCDP-B. En algunas líneas celulares fibroblásticas el mensajero de 4 kb es observado, pero como una banda menor. El MC de fibroblastos de pulmón normal o con FPI estimula la incorporación de timidina tritiada en las células BALB/c3T3, la cual es inhibida significativamente por el anticuerpo anti-FCDP. Estos resultados muestran que *in vitro*, los fibroblastos producen una proteína con actividad biológica semejante al FCDP, y ellos expresan el mensajero alterno de 2.8 kb. Este mensajero truncado en el extremo 5', ha sido caracterizado en células endoteliales. Interesantemente, se ha sugerido que esta forma posee un nivel de traducción mayor en comparación con el mensajero completo de 4 kb.

INDICE

INTRODUCCION

Fibrosis Pulmonar Difusa	2
Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas	
Propiedades Bioquímicas	4
Propiedades Biológicas	6
Propiedades Genéticas	9
Células Productoras	11

HIPOTESIS / OBJETIVOS

MATERIALES Y METODOS

Líneas Celulares	15
Obtención de la sonda	
Transformación genética de <i>E. coli</i> .	16
Amplificación del plásmido	17
Digestión con enzimas de restricción	18
Electroforesis del DNA plasmídico	18
Obtención de los insertos	19
Marcaje radiactivo del inserto	20
Obtención del RNA total	
Extracción del RNAm	21
Cuantificación del RNA	22
Electroforesis del RNA total	22
Transferencia del RNA	22
Hibridación del tipo Northern	23
Lavados de las membranas	24
Ensayo de la actividad mitogénica	
Concentración de los medios condicionados	25
Preparación del plasma pobre en plaquetas	25
Preparación del anticuerpo anti-FCDP	26
Incorporación de timidina- ³ H	26
Análisis estadístico	27

RESULTADOS

Obtención de la sonda cDNA	28
Obtención del RNA total	30
Actividad mitogénica	33

DISCUSION

36

REFERENCIAS

INTRODUCCION

El pulmón es un órgano estructural y funcionalmente muy estable a lo largo de la vida adulta y paradójicamente se caracteriza por una gran actividad metabólica, así como, por su rápida proliferación celular y remodelación tisular. Las proteínas del pulmón maduro se recambian en promedio cada 4 a 5 días y esta alta actividad biosintética incluye una regulación rigurosa que permite preservar la arquitectura y función del pulmón normal (1,2).

Bajo condiciones normales, la conservación de la composición tisular está regulada, entre otras cosas, por interacciones célula-célula, regidas a su vez, por la producción y secreción de mediadores celulares solubles o citocinas. En condiciones patológicas, perturbaciones del sistema pueden provocar una producción aberrante de citocinas que a su vez pueden inducir alteraciones irreversibles de la arquitectura del tejido (3). De aquí, la importancia fisiopatológica de las citocinas, también conocidas como factores de crecimiento o modificadores de la respuesta biológica (4). El estudio de tales modificadores se remonta al trabajo pionero de Alex Carrel (5); él notó que ciertas "sustancias contenidas en los jugos embrionicos" estaban dotadas con la propiedad de activar grandemente la velocidad de proliferación celular *in vitro*. Por ello, originalmente el término factor de crecimiento es alusivo a la propiedad mitogénica de la molécula; sin embargo, su papel es entendido ahora, en términos más amplios como señaladores celulares externos que inducen una variedad de respuestas tales como diferenciación, cambios de forma, locomoción, inhibición del crecimiento celular, así como proliferación (6).

Las citocinas llevan a cabo su efecto biológico mediante interacciones célula - célula ya sea a través de una vía autócrina o parácrina (7). En la ruta parácrina, una célula específica (efectora) produce y secreta el factor de crecimiento, modificando el comportamiento de otro linaje celular (célula blanco). En cambio, en el evento autócrino la célula efectora y la blanco son la misma.

La presencia de ciertas proteínas citocínicas o sus respectivos mensajeros, ha sido demostrada en el pulmón, donde modulan aspectos críticos relacionados con el crecimiento y remodelación del tejido. Estas citocinas incluyen al factor de crecimiento derivado de plaquetas, FCDP (8), el factor de crecimiento transformante beta, FCT- β (9), y la interleucina-1, IL-1 (10), entre otras. Se ha sugerido que estos factores contribuyen para la homeostasis del pulmón, ya que en condiciones normales sus genes se expresan en niveles bajos, controlando la estructura pulmonar (11). Estudios para identificar a las fuentes celulares de las diferentes citocinas en pulmón han demostrado que, entre otras, las células inmunes y los macrófagos alveolares son capaces de producir algunas de ellas. Específicamente, los macrófagos sintetizan y secretan FCDP, un mitógeno importante para las células de origen mesenquimatoso.

Por otro lado, se ha sugerido que los fibroblastos intersticiales, células estructurales del pulmón, no pueden ser vistos simplemente como células blanco pasivas cuyo comportamiento fenotípico esté determinado exclusivamente por células efectoras a través de un mecanismo parácrino. De hecho, se ha demostrado que los fibroblastos pulmonares producen algunas citocinas como por ejemplo, la interleucina-6 IL-6 (12), el factor de crecimiento semejante a insulina FCSI (13) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos FCEGM (11). Estos hallazgos demuestran que las células de origen mesenquimatoso son fuente importante de citocinas, y sugieren que pueden intervenir en el proceso proliferativo por un mecanismo parácrino y/o autócrino (14).

FIBROSIS PULMONAR DIFUSA

Bajo el término de FPD se agrupan un conjunto de padecimientos intersticiales del pulmón que se caracterizan por producir inflamación difusa y depósito exagerado de colágenas intersticiales (15). Estas enfermedades son habitualmente progresivas, incapacitantes y letales en un plazo relativamente breve (16).

La patogénesis de las enfermedades fibrosantes del pulmón incluye una compleja serie de eventos que actualmente son el foco de numerosas investigaciones tanto en la enfermedad humana como en modelos experimentales relacionados (17,18,19). Sin embargo, a pesar de múltiples estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* la secuencia de las alteraciones celulares y moleculares que ocurren durante el desarrollo de esta enfermedad se desconocen (20). La proliferación anormal de fibroblastos parece ser una de las piezas más importantes en el enlace entre la inflamación y la fibrosis (21,22), y de

hecho la expansión exagerada de esta población celular se encuentra siempre presente en los estadios intermedios de la evolución de la fibrosis pulmonar difusa, así como en la de diferentes modelos animales y suele preceder al depósito anormal de colágenos (23).

Los mecanismos responsables de inducir la proliferación de fibroblastos *in vivo* en condiciones fisiológicas, al igual que durante el desarrollo de la fibrosis no se conocen con precisión, pero existe un creciente cuerpo de evidencia experimental que sugiere que la liberación de diferentes factores de crecimiento por parte de células inflamatorias, en especial los macrófagos pulmonares, puede desempeñar un papel importante en este fenómeno (4).

En la fibrosis pulmonar se han descrito varios factores de crecimiento que afectan la replicación de fibroblastos, la mayoría de ellos secretados por células del sistema fagocítico mononuclear. Entre estos destacan el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de necrosis tumoral, la interleucina-1, la fibronectina, y el factor de crecimiento transformante beta (3).

Por otro lado, algunos estudios han sugerido que en la fibrosis pulmonar pueden existir algunas clonas de fibroblastos que presentan un descontrol intrínseco de los mecanismos que regulan su ciclo celular, lo que implicaría que estas células pueden ser capaces de producir algunos factores de crecimiento, los cuales a través de un mecanismo autócrino pueden conducir su propia duplicación exagerada (24).

En este contexto y de manera casi simultánea, Raghu y cols. (25) y Jordana y cols. (26) describieron que fibroblastos obtenidos de pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática proliferaban *in vitro* significativamente más rápido que fibroblastos de pulmón normal, bajo las mismas condiciones de cultivo y en ausencia de otras células que influenciaran su crecimiento.

Por otro lado, estudios realizados en arterioesclerosis apoyan indirectamente la posible existencia de un mecanismo autócrino en la replicación exagerada de células de origen mesenquimatoso durante el desarrollo de la fibrosis (27,28). En esta enfermedad existe una proliferación anormal de células musculares lisas y recientemente se ha demostrado que el medio de cultivo condicionado de estas células, obtenidas de placas arterioescleróticas, estimulan significativamente la proliferación de células musculares lisas normales (29). Mediante la técnica de hibridación tipo northern y ensayos de competencia

se ha demostrado que cuando menos uno de los factores de crecimiento expresados es el FCDP (30,31).

FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS PROPIEDADES BIOQUIMICAS

Primeramente, el FCDP fue observado en el cultivo de fibroblastos de embrión de pollo. El crecimiento de la línea fue mantenido, al utilizar medio suplementado con suero (32,33). Posteriormente, el término factor de crecimiento derivado de plaquetas fue introducido simultáneamente por Ross y col. (29) y Kohler y Lipton (34). Ellos demostraron que el suero derivado de plasma carecía de actividad promotora del crecimiento, pero que ésta se podía restablecer por la adición de un sólo tipo celular: las plaquetas. De esta fuente celular se aisló por primera vez el FCDP, el cual es una glicoproteína catiónica muy estable al calor (100°C). La molécula del FCDP tiene un peso molecular de 30 kDa aproximadamente; se han identificado 2 subunidades llamadas cadena A y B, con un peso molecular aproximado de 16 y 14 kDa, respectivamente.

El análisis de la estructura primaria revela que ambas cadenas poseen aproximadamente 60% de similitud. Cada polipéptido posee gran número de enlaces disulfuro y la unión entre las dos cadenas está dada por puentes disulfuro inter e intracadena, formados con un total de 16 residuos cisteínicos (35).

A pesar de la relación existente entre ambas cadenas, su localización cromosómica en los humanos es diferente. El gen del FCDP-A se extiende de 22-24 kb sobre el brazo largo del cromosoma número 7 (36) y del FCDP-B abarca una región de 23 kb que se encuentra en el cromosoma número 22 (37,38).

Por otro lado, se ha demostrado similitud entre la cadena B y una porción del producto génico v-sis, del virus transformante de sarcoma de simio; SSV (39,40,41). La secuencia v-sis codifica para una proteína (p28^{sis}), formada por 160 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 18 kDa, esencialmente el mismo tamaño de la cadena B, estimado por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. La discrepancia encontrada en la literatura, en

relación al peso asignado al FCDP-B, puede deberse a modificaciones postraduccionales (glicosilación, rompimiento proteolítico, entre otras.), que puede sufrir la molécula precursora (42).

Las células transformadas con SSV producen p28^{sis}, la cual sufre una serie de procesamientos que incluyen la formación de dímeros y rompimiento proteolítico (43), generando la forma biológicamente activa (p28^{sis}), reconocida por el anticuerpo anti-FCDP (44). Por las similitudes estructurales e inmunológicas, la cadena B del FCDP es llamada c-sis, representando la contraparte protooncogénica del v-sis (45).

Al igual que la p28^{sis}, el FCDP para ser considerado biológicamente activo debe estar ensamblado, formando homo o heterodímeros, las 3 isoformas conocidas son: AA, BB y AB (46). La reducción de los puentes disulfuro destruyen irreversiblemente la actividad biológica de los dímeros (47).

Los eventos celulares que desencadena el FCDP, son el resultado de la interacción del dímero con receptores específicos (FCDP-R) que están presentes en la superficie celular (48). El receptor está formado de 3 dominios: el extracelular con 5 unidades repetidas, el dominio hidrofóbico que se extiende en la membrana celular y por último, la porción intracelular que posee actividad de tirosina cinasa (49).

Los FCDP-R se sintetizan como proteínas precursoras de 140-160 kDa, que una vez maduras alcanzan un tamaño final de 170-180 kDa, como resultado de modificaciones postraduccionales (50).

Por estudios de clonación y de enlace de ligando radiactivo, se han identificado 2 clases de receptores: α y β (51). El modelo propuesto para la interacción receptor-ligando, involucra la asociación de dos subunidades receptoras: $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ y $\beta\beta$. De acuerdo a este modelo, el receptor α reconoce y enlaza a las cadenas A o B, mientras el receptor β reconoce solamente a la cadena B, por lo tanto, el receptor $\alpha\alpha$ reconoce las 3 isoformas del FCDP (52,53).

Grotendorst y col. (54) demostraron que los fibroblastos dérmicos humanos poseen únicamente receptores del tipo β , por lo tanto, no encontraron respuesta celular al adionar FCDP-AA recombinante, en cambio estas células responden igualmente bien a la adición de los dímeros recombinantes AB o BB. En contraste, los fibroblastos de pulmón humano,

responden a la adición de las 3 isoformas recombinantes del FCDP, con una incorporación similar de timidina-³H (55). La aparente contradicción entre ambos estudios se ha interpretado como diferencias tejido-específicas de los fibroblastos.

PROPIEDADES BIOLÓGICAS

La interacción FCDP/receptor inicia una serie de eventos intracelulares, que culminan en la síntesis del DNA. El FCDP es conocido por su actividad mitogénica sobre fibroblastos, células del músculo liso, células gliales y condrocitos (56).

Para que la mitosis ocurra, las células deben pasar por una serie de eventos perfectamente ordenados, conocidos como fases del ciclo celular. La síntesis del DNA se lleva a cabo en la fase S, pero las células deben pasar previamente por la fase de transición Go/G1, seguida de la fase G2 (57,58,59). Para evaluar la actividad biológica del FCDP en medios condicionados, se ha empleado el modelo ahora clásico, de la incorporación de timidina-³H por células blanco BALB/c3T3 (60). Con el empleo de este método, se demostró que el FCDP es el prototipo de los factores de crecimiento llamados factores de competencia, cuya característica es disparar los eventos tempranos del ciclo celular. Los factores de competencia inducen la transición Go/G1, requisito indispensable pero no suficiente para la realización de la mitosis. Para avanzar en la fase G1, es necesaria la presencia de otra clase de citocinas complementarias llamados factores de progresión. La fuente de estos factores, utilizada en el sistema BALB/c3T3, es el plasma pobre en plaquetas (61). Los procesos posteriores para la síntesis del DNA y la mitosis son automáticos, esto es, no están sujetos a control citocínico (62).

La interacción del FCDP y su receptor induce una cascada de eventos que incluyen la activación de fosfolipasas membranales con el consecuente rompimiento de fosfolípidos de la membrana celular, principalmente el fosfatidilinositol. El rompimiento de fosfolípidos induce la formación de diglicéridos, que por un lado activan a la cinasa C (63) y por el otro, provocan un incremento del calcio intracelular. Otros cambios en los iones intracelulares son; el incremento en la actividad antiporte $\text{Na}^+\text{-H}^+$ e incremento en la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (64). También se estimula el transporte de aminoácidos (65) y el reordenamiento de los filamentos de actina (66,67).

Algunos estudios indican que las diferentes formas dimericas del FCDP no son igualmente activas (62). Por ejemplo, el heterodimero AA presenta menor actividad en estimular quimotaxis, mitogénesis, reorganización de los filamentos de actina y autofosforilación del receptor del FCDP en comparación con el homodimero AB. Ambos dímeros fueron aislados de una línea celular de glioma (68).

En otro estudio, se encontró que el medio condicionado obtenido de células transfectadas con el cDNA del FCDP-B resultó más mitogénico que cuando la transfección fue realizada con FCDP-A, a pesar de haber encontrado niveles semejantes de proteína, en ambos casos (42).

Igualmente, Grotendorst y col. (54) encontraron diferencias en las diversas respuestas biológicas atribuidas al FCDP, en tres líneas celulares analizadas. El homodimero AA no presenta actividad mitogénica ni quimotáctica para células del músculo liso derivados de aorta bovina ni para fibroblastos de piel humana. En cambio, en células transformadas de embriones de ratón (NIH/3T3) están presentes ambas actividades, provocadas por el FCDP-AA. En cuanto a la capacidad de hidrólisis del bifosfato de fosfatidil inositol (PIP_2), las isoformas AB y BB fueron estimuladoras de la hidrólisis en las tres líneas mencionadas, mientras el dímero AA únicamente fue efectivo en la línea NIH/3T3. Los 3 dímeros fueron igualmente eficientes en estimular la autofosforilación del receptor en las tres líneas probadas, sin embargo, solamente las formas conteniendo cadena B, fueron activas en los fibroblastos y células del músculo liso. En la determinación de los niveles relativos de los receptores tipo α y β en los tres tipos celulares, fue reportado que las células NIH/3T3 presentan los dos tipos de receptores, mientras los fibroblastos de piel humana y células de músculo liso de bovino se encontró únicamente receptores del tipo β . Por lo tanto, la presencia de receptores alfa son esenciales para que las células respondan al FCDP-AA.

Aparentemente, la respuesta celular al FCDP puede estar determinada ya sea por la expresión de los diferentes tipos de receptores en las células blanco, o por diferencias inherentes a la potencia del FCDP-A o FCDP-B (69). Es decir, todas las formas del FCDP son mitogénicas para células que posean el complemento apropiado de receptores afines (70). Esto ha sido elegantemente demostrado, a través de estudios de transfección, en donde respuesta al FCDP puede ser establecida en las líneas celulares que normalmente no responden al factor, por la introducción de cDNA para receptores tipo α o β (71).

En franca oposición a lo anterior, se encuentra el estudio realizado con la línea celular AKR-2B de fibroblastos de ratón que posee la expresión similar de receptores α y β (72), así como el importante hecho que el número de receptores α no es modificado significativamente durante el cultivo celular (73). Ambas características fueron aprovechadas por Simm y col. (74), quienes demostraron diferencias en los efectos biológicos por la adición de las isoformas recombinantes en éste sistema celular, ya que la proteína recombinante del FCDP-A (rFCDP-AA) es incapaz de inducir la incorporación de timidina- ^3H , mientras el rFCDP-BB y AB estimularon la división celular en un 90%. Sorprendentemente, el rFCDP-AA estimula 25% la autofosforilación en tirosina de su receptor, en comparación con el rFCDP-AB y BB. Además, seguido de la autofosforilación del receptor, existe un incremento en la actividad cinasa, resultando en la fosforilación de las proteínas celulares. En este sentido, las tres isoformas provocaron un patrón muy similar de fosforilación, indicando que existen proteínas blanco comunes. Sin embargo, el patrón de fosforilación para el rFCDP-BB presentó mayor grado de fosforilación. También en la fosforilación de fosfolípidos marcados con ^{32}P , fue establecido un resultado semejante: el rFCDP-BB efectivamente incrementa los niveles de fosfatidilinositol- ^{32}P , de ácido fosfatídico- ^{32}P y algo del fosfato de fosfatidilinositol- ^{32}P . En cambio, los rFCDP-AA y AB solamente causaron incremento moderado en el nivel de los mismos fosfolípidos. En suma, la autofosforilación del receptor en tirosina no está correlacionada con otros efectos, por ejemplo; la nula actividad mitogénica y el gran nivel en la fosforilación celular. Al parecer son rutas diferentes que podrían ser activadas en grados variables por los diferentes tipos de receptores, interactuando en diversos pasos de la cascada de la traducción de la señal (75,76). La incapacidad del rFCDP-AA de actuar como mitógeno, aunque estimula efectivamente varios eventos tempranos como: autofosforilación en tirosina, fosforilación proteica total y síntesis de fosfolípidos- ^{32}P , sugiere que algunos de los eventos tempranos pueden estar involucrados únicamente en el "mantenimiento" celular (77).

Por otro lado, al FCDP se le había atribuido propiedades vasoconstrictoras y actividad quimotáctica para monocitos y macrófagos. Sin embargo, Graves y col. (78) demostraron que el homodímero BB, producido *in vitro* por la expresión del gen c-sis, no posee actividad quimotrayente para las células mononucleares ni propiedad vasoconstrictora. Las observaciones iniciales fueron probablemente el resultado de contaminación en las preparaciones del FCDP.

Por último, los estudios a nivel genético indican que el FCDP induce la expresión de un grupo de genes: c-myc, c-fos y c-jun (79,80), cuyos productos proteicos están localizados en el núcleo celular. Fos y Jun funcionan aparentemente juntos como reguladores de la transcripción (62), formando heterodímeros que pueden enlazar los sitios AP-1 (81).

La inducción de los RNAm de c-myc y c-fos por el FCDP-BB, fue demostrada por Leof y col. (82), quienes utilizaron células provenientes de embriones de ratón estimulados con el FCT- β . La expresión del c-sis fue observada a los 20 min de la estimulación y la expresión de c-myc y c-fos fue detectada 4 horas después de la inducción. Cuando la misma línea celular se estimuló directamente con el FCDP-B purificado, el RNAm c-myc se detectó 1 hr después de la inducción. Con este estudio cinético, fue observado que el FCDP estimula la expresión de proteínas nucleares indispensables para la síntesis del DNA, demostrando la acción directa de este factor en la mitogénesis.

PROPIEDADES GENÉTICAS

Los mecanismos que regulan la transcripción del FCDP no se conocen con precisión y se ha sugerido la existencia de interacciones complejas entre reguladores positivos y negativos. Probablemente la expresión basal e inducible del gen del FCDP, es controlada por factores trans y elementos cis. La clonación del gen del FCDP-B ha hecho posible la localización y análisis de su región promotora (83, 84). En este sentido, se han realizado estudios estructurales del gen del FCDP para identificar los puntos de regulación, dados por las secuencias de DNA y la interacción con proteínas nucleares (85).

El gen de la cadena B del FCDP ha sido identificado en el cromosoma 22 humano y está ordenado en 7 exones extendidos a lo largo de 23 kb (86). Los elementos reguladores de la transcripción se encuentran distribuidos en la región promotora, exón 1 y hacia el extremo 3' del gen c-sis (87,88,89).

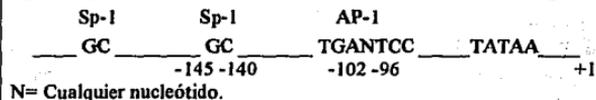
Regulación transcripcional

De los elementos cis que interaccionan con proteínas nucleares, se han identificado la secuencia TATA y dos sitios potenciales (CCGCCC) enlazadores del factor Sp-1 (90,91). La secuencia consenso perfecta (TGANTCA) para enlazar a AP-1 está localizada en la posición -2948 (92,93). Aunque esta secuencia no ha sido indispensable en la activación del promotor

c-sis, se sabe que los elementos potenciadores (enhancers) son capaces de funcionar a pesar de las grandes distancias a las que se encuentran de sus promotores (94).

Por ensayos de supresión de la región promotora del c-sis, se han establecido las secuencias indispensables en la transcripción del gen. Pech y col. (87) demostraron la existencia de otra secuencia (TGANTCC), localizada en la región -102-96, difiriendo de la secuencia perfecta para AP-1 por un cambio de base (A por C) establecida en SV40 (95). Sin embargo, estudios de mutación y actividad del gen reportero CAT, revelaron que la supresión completa de la secuencia semejante a AP-1 no tuvo influencia sobre la actividad del promotor, en la diferenciación de las células eritroleucémicas, línea K562 (96), a megacariocitos por 12-miristato-13-acetato de forbol; TPA (97,98). En contraste, la supresión del promotor -145 -140 disminuye la expresión del c-sis (Fig.1). La secuencia mínima para que se lleve a cabo la transcripción del gen c-sis, incluye 42 pb anteriores a la caja TATA, en el sistema K562-TPA.

Fig. 1 Representación esquemática de elementos cis/trans del gen del FCDP.



Recientemente, se ha identificado un elemento cis, formado por 2 secuencias repetidas (TCTC y CACC), en configuración ABBA. Se le ha denominado SPE (elemento próximo a sis), localizado en la posición -58 -39 relativo al sitio de inicio del RNAm del c-sis. El elemento provoca la activación transcripcional (50 veces mayor) del gen de la cadena B, en el sistema K562-TPA. Utilizando el ensayo de cambio en la movilidad electroforética, se demostró que SPE enlaza específicamente factores nucleares, aún no identificados. La secuencia SPE está altamente conservada (19/20 nt) en diversos genes: humano, gato y ratón (99). También, SPE está presente en dos sitios (-585 y +722) de la región promotora del FCDP-A humano (100).

Extremos 5' y 3'

La secuencia no codificada del extremo 3', incluye regiones ricas en AU, implicadas en desestabilizar los mensajeros de las citocinas (101). Específicamente se ha demostrado que el RNAm de c-sis posee una vida media corta de 70 a 120 min., lo que posiblemente se relaciona con el efecto de la región rica en AU (102,103).

El extremo 5' se caracteriza por su alto contenido en GC. Rao y col. (84) encontraron que la supresión de parte del extremo 5' incrementaba 40 veces la eficiencia de la traducción del FCDP-B. Esto sugería que el extremo 5' del mensajero posee un efecto inhibitor a nivel de la traducción, posiblemente por la formación de una estructura secundaria en el RNAm, cercana al codón de iniciación AUG.

Interesados en el efecto inhibitor de la traducción del extremo 5', Fen y Daniel (104) identificaron y caracterizaron los RNAm de 3.8 y 2.8 kb del c-sis, en células endoteliales. La diferencia entre ambos mensajeros fue encontrada, sorprendentemente, en el primer exón del gen. El mensajero pequeño retiene solamente 80 nt de los 1088 nt establecidos en la secuencia del exón 1. Por lo tanto, el RNAm de 2.8 kb no posee el efecto inhibitor para realizar la síntesis de proteínas. El mensajero de 3.8 kb posee 3 sitios potenciales para iniciar la traducción del RNAm c-sis, localizados en las posiciones +582, +751 y +870. Estos marcos de lectura abierta podrían codificar péptidos de 5, 42 y 12 aminoácidos, respectivamente. La exclusión de los 3 codones AUG del mensajero de 2.8 kb, puede mejorar la eficiencia por eliminar iniciadores de la traducción no productivos.

El nivel tan bajo (2-3%) del transcrito de 2.8 kb, respecto al completo de 3.8, puede representar niveles equivalentes de proteína del FCDP-B, independientemente del mecanismo por el cual sea lograda la eficiencia traduccional (104).

CELULAS PRODUCTORAS

Se han reportado varios tipos celulares capaces de producir el FCDP y con excepción de las plaquetas que lo almacenan, las otras células lo secretan al medio extracelular. Por ello, es posible la inmunováloration en los medios condicionados, utilizando antisero anti-FCDP

y/o los ensayos de competencia del receptor, adicionando el FCDP-¹²⁵I. En la Tabla 1 se muestran los orígenes celulares del FCDP.

Así mismo, ha sido encontrada actividad similar al FCDP en células transformadas con el virus del sarcoma de simio (SSV). Con la caracterización tanto del gen como del producto proteico causante de la transformación, fue establecida la similitud existente entre FCDP/c-sis y el gen transformante de SSV, llamado v-sis (40,41).

Por lo tanto, ha sido establecida actividad mitogénica similar al FCDP en los medios condicionados de células transformadas con SSV, en células de tumores espontáneos y en diversos tipos celulares normales (114).

Tabla 1. Células productoras del FCDP

Tipo celular	Referencia
<u>Células no transformadas</u>	
Células músculo liso	Seifert y col. (105)
Células endoteliales	DiCorleto & Bowen-Pope (106)
Citotrofoblastos	Goustin y col. (107)
Macrófagos Alveolares Humanos	*Mornex y col. (108)
Monocitos activados	Martinet y col. (109)
Células epiteliales	Antoniades y col. (110)
Fibroblastos de rata	*Fabisiak y col.(14)
<u>Tumores espontáneos</u>	
U2-OS (osteosarcoma)	Heldin y col. (111)
Glioblastoma y sarcoma	*Eva y col. (112)
Tumor del músculo liso	*Norris y col. (113)

La detección del FCDP se llevo a cabo por el ensayo de competencia del enlace por el receptor, utilizando FCDP-¹²⁵I. * Detección del RNAm c-sis.

El FCDP está involucrado en procesos fisiológicos y/o patológicos de las células productoras. Eva y col. (112) demostraron que la producción aberrante de la cadena B, correlaciona con ciertos tumores de origen mesenquimatoso, específicamente fibrosarcoma y glioblastoma.

Asimismo, en la fibrosis pulmonar se ha reportado que la proliferación de fibroblastos y el incremento en la síntesis de colágena, son los cambios fundamentalmente encontrados en esta enfermedad (115,116). Debido a la potente actividad mitogénica del FCDP, se le ha valorado como una molécula potencialmente importante en la patogénesis de los desórdenes fibroproliferativos del pulmón. De hecho, se ha detectado por hibridación *in situ* el incremento en el RNAm y en la proteína del FCDP-B en biopsias de pacientes con FPI (117). Específicamente, ha sido establecida la liberación espontánea del FCDP por los macrófagos alveolares de pacientes con FPI (118). En cuanto a los fibroblastos de pulmón humano, han sido catalogados como células capaces de responder mitogénicamente, mediante el incremento en la incorporación de timidina-³H, a la adición de las isoformas recombinantes del FCDP (55). Con éstos antecedentes experimentales, se ha demostrado que la respuesta proliferativa de los fibroblastos es ejercida mediante la ruta parácrina.

Tratando de identificar el RNAm o la actividad mitogénica semejante al FCDP, en fibroblastos de pulmón, Fabisiak y col. (14), establecieron la producción espontánea en fibroblastos de pulmón de rata, únicamente de la cadena A. Estos resultados sugieren una respuesta autócrina del FCDP-A en esta especie animal. Sin embargo, en este estudio no fue posible determinar la expresión de ninguna de las dos cadenas del FCDP en fibroblastos derivados de pulmón humano.

HIPOTESIS

Los fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar producen y secretan el factor derivado de plaquetas cadena A y B. Debido a su potente actividad mitogénica sobre esta estirpe celular y actuando de manera autócrina intervienen en este proceso patológico.

OBJETIVOS

1. Determinar si los fibroblastos derivados de pulmón humano expresan las cadenas A y/o B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP) y si lo secretan al medio extracelular.
2. Determinar si existen diferencias de expresión y producción del FCDP cadena A y/o B entre los fibroblastos derivados de pulmón normal en comparación con aquellos obtenidos de pulmones fibróticos.

MATERIALES Y METODOS

I. LINEAS CELULARES

Se aislaron fibroblastos de pulmones normales (N2 y NA) y fibróticos (H1PF-8, H1PF-13, H1PF-19, H1PF-40) por el método de dispersión enzimática con tripsina. Se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) dos líneas derivadas de pulmón normal: CCD11-Lu y LL-24 y una de pulmón fibrótico, la LL-29.

Las células se cultivaron en medio FK12 (Sigma) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10 ó 15% (Gibco, BRL) y antibióticos: 100U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomycin y 0.25 mg/ml de anfotericina B (Sigma).

Además, se utilizó como control positivo la línea celular U2-OS proveniente de osteosarcoma humano, dado que produce constitutivamente el FCDP. Estas células se crecieron en medio MacCoy suplementado con 2.2 g/l de bicarbonato de sodio (Sigma) , 20% de SFB (Gibco, BRL) y la mezcla de antibióticos antes mencionada.

En términos generales el protocolo que se empleó para el cultivo de las células fue el siguiente:

Los crioviales que contenían los fibroblastos se descongelaron rápidamente (1 a 3 min.) a 37-40°C. El contenido se vació a un tubo de 15 ml con medio y 10-15% de suero fetal bovino (SFB), desactivado previamente a 56°C por 30 min. Después de centrifugar 10 min a 300-800 rpm el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en medio con SFB. La suspensión celular se sembró en una caja de 25 cm² ó 75 cm² (Falcon) y las células se incubaron a 37°C en ambiente húmedo con una atmósfera de 95% O₂/5%CO₂. El medio se cambió 2 ó 3 veces por semana hasta alcanzar confluencia. Para la obtención de medio condicionado (MC), se lavó la monocapa celular con amortiguador de fosfatos 1X pH 7.4 (PBS) y se adicionó medio sin suero. Después de incubar 24 h, se colectó el MC el cual se almacenó a -20°C hasta su uso.

II. OBTENCIÓN DE LA Sonda

1) Transformación genética de *Escherichia coli*.

La cepa de *Escherichia coli* SF8 (C600, Thr C, Leu B6, Thy A, hsd RK, hed MR) (119) se transformó con las siguientes clonas:

1) pSM-1 (ATCC) posee un fragmento de 2 kb que contiene parte del gen del factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena B, dicho inserto se obtuvo por la digestión con Bam HI (Gibco, BRL).

2) PDGF-A (donada amablemente por Mark W. Majesky) posee un fragmento de 1.3 kb que contiene parte del gen del factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena A. Dicho inserto se obtuvo por la digestión con Eco RI (Gibco, BRL).

3) pHcGAD (ATCC) posee un fragmento de 750 pares de bases (pb) con la información genética para el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Para la obtención del inserto se utilizaron las enzimas Xba I y Pst I (Gibco, BRL).

Para la transformación bacteriana se empleó el método del CaCl_2 , reportado por Hanahan (120). La metodología que se utilizó fue la siguiente:

Primeramente, se inoculó 3 ml de caldo LB con una colonia de *E. coli* y se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente el cultivo se diluyó 1:50 y se incubó de 2.5 - 3 h a 37°C y se centrifugó a 3000 rpm 10 min a temperatura ambiente (TA). La pastilla se resuspendió en 10 ml de CaCl_2 50 mM a 4°C, y se incubó sobre hielo 5 min. Después de centrifugar a 3000 rpm 10 min a 4°C, se resuspendió la pastilla en 1/15 del volumen original con CaCl_2 50 mM a 4°C. La suspensión celular se incubó en hielo 10 min. Posteriormente, se alicuotó 0.2 ml de la suspensión de células ya competentes, en tubos eppendorf. Algunas muestras se almacenaron a -70 °C, para lo cual se adicionó a cada tubo 15% de glicerol estéril. Para la transformación se tomó una alicuota de 0.2 ml de células competentes, se incubó en hielo por 25 min, junto con 0.1 ml del DNA recombinante con una concentración de 0.1 ng diluido en Tris-HCl 10 mM. El choque térmico se realizó incubando la muestra a 42°C 2 min, seguido de 10 min a TA. Para la recuperación física de la bacteria a los 0.3 ml de la

mezcla resultante, se le adicionaron 3 ml de caldo LB, y se incubó 1 h a 37 °C, sin agitación. La centrifugación se realizó a 3000 rpm 10 min a TA. Después de decantar, la pastilla se resuspendió con el líquido residual de las paredes y se sembró en agar LB más antibiótico, para seleccionar las colonias transformantes amp^r o tet^r, después de un período de incubación de 24 h a 37°C. Para la preservación de la cepa transformada, se sembró una colonia en 20 ml de caldo LB, incubando a 37°C toda la noche. Para preservar la cepa transformada, se tomó una alícuota de 0.8 ml y se almacenó a -70°C, en crioviales que contenían 20% de glicerol.

2) Amplificación del Plásmido

Una vez seleccionada la bacteria transformada se realizó la amplificación, siguiendo una modificación al método de lisis alcalina, reportado por Birboim y Doly (121). Para ello, se inocularon 0.6 ml de la cepa bacteriana en 250 ml de caldo LB con 50 µg/ml de ampicilina o 12.5 µg/ml de tetraciclina. La bacteria creció toda la noche con agitación vigorosa (250 rpm) a 37°C. La suspensión se centrifugó a 5000 rpm por 15 min, resuspendiendo la pastilla en 6 ml de Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 y sacarosa al 15%. Se adicionó lisozima (2 mg/ml), preparada justo antes de ser usada, la mezcla reposó en hielo 20 min, después se pasó a tubos corex que contenían buffer de lisis (12 ml de NaOH 0.2 M y SDS 1%). Se mezcló por inversión y se incubó en hielo 10 min.

A cada tubo se agregó 7.5 ml de acetato de sodio 3 M pH 4.6, igualmente se mezcló por inversión, incubando ahora la mezcla por 20 min en hielo. La centrifugación se realizó a 10 000 rpm por 30 min. El sobrenadante se removió cuidadosamente del tubo, evitando el precipitado blanco. Para la remoción del RNA contaminante en la preparación, se agregó RNasa 1 mg/ml a cada tubo, incubando 30 min a 37°C. Para la extracción del plásmido, se adicionó un volumen de fenol /CHCl₃ (1:1), por volumen de fase acuosa, centrifugando la mezcla a 10 000 rpm 20 min, y la fase acuosa se guardó en otro tubo. Para aumentar el rendimiento del plásmido, es necesaria otra extracción, por lo que a la fase orgánica se le agregaron 0.5 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 7.4, nuevamente se centrifugó y combinó esta segunda fase acuosa con la primera. La concentración del plásmido se realizó con 1 volumen de isopropanol a 4°C, precipitando toda la noche a -20°C. El material precipitado se centrifugó a 10 000 rpm 20 min a 4°C. La pastilla se solubilizó con 1.6 ml de H₂O, y se precipitó con 2 ml de polietilenglicol 13%, NaCl 400 mM, por 1 h sobre hielo. La mezcla

se centrifugó a 10 000 rpm 10 min a 4°C, y la pastilla se resuspendió con 150-300 µl de agua.

3) Digestión con enzimas de restricción.

La digestión de la clona pSM-1 con Bam HI genera 3 fragmentos : 2.7, 2.0 y 0.63 kb. El segmento de 2 kb posee parte del gen del factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena B (122).

La digestión de la clona pUC-13-D1 con Eco R1 genera 2 fragmentos: 2.7 y 1.3 kb. El segmento de 1.3 kb posee parte del gen del factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena A (36).

La digestión de pHcGAD se realizó con Xba I y Pst I con la producción de 2 fragmentos: 4.85 kb y 750 pb. El inserto pequeño contiene la información genética necesaria para reconocer al RNAm del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (123).

Para la digestión, se tomó una alícuota de la muestra de interés y se adicionó 1/10 de volumen de amortiguador específico de la enzima, más la(s) enzima(s); tomando en cuenta que 1 unidad de endonucleasa de restricción digiere 1 µg de lambda DNA. La mezcla se incubó 1 h a 37°C. La reacción se paró por la adición del amortiguador de carga (bromofenol 2%, TAE 5X, EDTA 0.1M y glicerol 50%). A continuación, la mezcla se separó por electroforesis. Para ello, la muestra se desnaturizó durante 5 min a 65°C y un minuto en hielo. Las muestras fueron colocadas en cada pozo del gel.

4) Electroforesis del DNA plasmídico.

La preparación del plásmido digerido y sin digerir, fue separada por electroforesis horizontal utilizando geles de agarosa, reportado por Johnson y Grossman (124). El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

Primeramente, la agarosa se fundió con TAE IX (Trizma-base 40 mM, EDTA 1mM y ácido acético glacial 20mM). La mezcla se vació al soporte de la cámara de electroforesis. Se utilizó TAE IX como amortiguador de corrida y una corriente eléctrica de 60 volts.

Se estimó el tamaño de los fragmentos generados en la digestión del plásmido, por comparación con las bandas de lambda DNA (Sigma, Tipo III) cortado previamente con Hind III y Eco R1 (Gibco, BRL). Las bandas se hicieron visibles, incubando el gel por 20 min con bromuro de etidio 0.5 µg/ml (119) y su exposición a través del Transiluminador UV de onda media; 300 nm (Hoefer Scientific Instruments).

Una vez comprobado que el tamaño de las bandas corresponde a los reportados, se realizó la digestión de la muestra. De esta manera, se obtuvieron los insertos de interés: 2 kb (factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena B), 1.3 kb (factor derivado de plaquetas cadena A) y 750 pb (gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa).

5) Obtención de los insertos.

El método empleado para la obtención de los insertos a partir del gel de agarosa fue reportado por Dretzen y col. (125). El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

Primeramente, se cargó la digestión de la muestra a los pozos del gel de agarosa, controlando con lámpara de UV la banda de interés. Se permitió la separación de los diversos fragmentos, después de lo cual se realizó un corte longitudinal por abajo de la banda, insertando el papel de DEAE-celulosa (Whatman DE-81) previamente equilibrado (el papel se saturó 30 min con NaCl 2.5 M y se lavó 4 veces con agua).

Se aplicó una corriente al gel de 100 V, el tiempo suficiente para que la banda se adhiera al papel. El papel se pasó a un tubo eppendorf y la muestra se eluyó con NaCl 1.5 M en el amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4 y EDTA 1 mM pH 8), por espacio de 2 h a 37°C. La solución resultante se transfirió a otro tubo, para ello se realizó un orificio con una aguja en el fondo del primer tubo, introduciendo el primer tubo en el segundo, y se centrifugaron ambos tubos de 30 a 40 seg. La extracción del inserto se realizó con volúmenes iguales de fenol/ CHCl₃ (1:1) y cloroformo/ alcohol isoamílico (49:1). La fase acuosa se colectó y adicionó 1 ml de isopropanol a 4°C. La precipitación se realizó toda la noche, después se centrifugó a -10°C 1h a 10 000 rpm. El isopropanol se decantó con sumo

cuidado, y se permitió la libre evaporación del solvente. La pastilla invisible se resuspendió con el volumen remanente o agua adicional, para un volumen final de 5-10 μ l. Para asegurar la pureza de la preparación, se corrió un gel de agarosa con 1 μ l del inserto purificado.

6) Marcaje radiactivo del inserto.

Se utilizaron de 50-100 ng aproximadamente de DNA templador, por marcaje. La cuantificación se llevo a cabo por teñir con bromuro de etidio, una alícuota del inserto separado en el gel de agarosa. La brillantez de la banda del inserto se comparó con otra de concentración conocida: λ DNA. Cada inserto se marcó con dCTP(α - 32 P), utilizando la técnica del marcado por extensión al azar, reportado por Feinberg y Vogelstein (126), empleando un sistema disponible comercialmente. (Du Pont, NEN Research Products). El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

Primero, se resuspendieron de 50 a 100 ng del inserto en 7 a 12 μ l de amortiguador TE. El DNA se desnaturizó por calentamiento a ebullición 5 min y uno en hielo y se adicionaron 6 μ l de buffer RPE (extensión del iniciador al azar), al DNA templador ya desnaturizado, más 6 μ l de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados. Posteriormente, se agregaron 5 μ l de dCTP(α - 32 P) (Actividad específica 6000 Ci/mmol). Por último, la reacción se inició por adicionar 1 μ l de la DNA polimerasa (fragmento Klenow). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 3 h.

La reacción se paró por la adición de 2 μ l de EDTA 0.5 M pH 8. Para la precipitación del inserto marcado se agregaron 5 μ l de acetato de sodio 3M pH 7.4, 10 μ l de DNA espermatozoario de salmón (5mg/ml) y 125 μ l de etanol a 4°C. La mezcla se precipitó durante 5 min a temperatura ambiente. Para obtener la pastilla se centrifugó 10 min. Cuidadosamente, se removió el sobrenadante con una pipeta y el precipitado se resuspendió con 200 μ l de amortiguador TE. Para medir la eficiencia del marcaje, se contó la radiactividad de tipo Cerenkov, el cual consiste en colocar 1 μ l de la sonda marcada en un tubo eppendorf e introducirlo a un vial de centelleo seco. La eficiencia del conteo de la radiación Cerenkov es del 27% (Tri-carb 4000 series Liquid Scintillation Counter).

II. OBTENCION DEL RNA TOTAL

1) Extracción del RNA

Se siguieron las recomendaciones reportadas en la literatura para la obtención del RNA total íntegro (119).

Para la obtención del RNA total, se utilizó el método del paso único con la extracción de isotiocianato de guanidina y fenol /cloroformo, reportado por Chomczynski y Sacchi (127). El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

Las líneas celulares una vez confluentes en cajas de 75 cm², se sometieron a la extracción del RNA total. El medio gastado se removió y la capa celular se lavó con PBS a 4°C. A cada caja se agregó solución D (isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, N-laurilsarcosin 0.5% y el 2-mercaptoetanol 0.1M se adicionó justo antes de usar la solución), lavando la caja con la misma solución que se pasó a un tubo corex .

Ya en el tubo corex, se adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 2 M pH 4, 1 volumen de fenol, más 1/20 de volumen de cloroformo /alcohol isoamílico (49:1) . Después de la adición de cada reactivo se mezcló perfectamente. Después se homogenizó la muestra con vortex 10 segundos y se colocó sobre hielo 15 min.

Para la separación de nuestro material de interés se centrifugó a 10 000 rpm por 20 min a 4°C, el RNA es encontrado en la fase acuosa, mientras las proteínas y el DNA se encuentran en la interfase. La fase acuosa se recuperó y mezcló con 1 volumen de isopropanol a 4°C, se precipitó a -20° toda la noche o a -70°C 1 h. La pastilla con el RNA se obtuvo por centrifugación a 10 000 rpm, 20 min a 4°C. El RNA se disolvió en 300 µl de solución D, para ser sometido a una precipitación con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5 y 2.5 volúmenes de etanol frío, dejando precipitar toda la noche a -20°C. El RNA total se obtuvo por centrifugación a 10 000 rpm 20 min a 4°C, y se resuspendió con amortiguador TE. El material se almacenó a -70°C hasta su uso.

2) Cuantificación del RNA

Se realizó la cuantificación espectrofotométrica del RNA con una longitud de onda de 260 nm. Una D.O. equivale a 50µg/ml de RNA total. La misma muestra se analizó a 280 nm, para comprobar la pureza de la preparación. La relación obtenida entre 260/280 puede abarcar de 1.7 a 2, asegurando una buena desproteínación de la muestra.

3)Electroforesis del RNA total

Una vez obtenido el RNA, se realizó la separación electroforética en geles desnaturizantes por el método del formaldehído, reportado por Thomas (128). El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

Se fundió 1 g de agarosa en 75 ml de H₂O, y se adicionó 8.3 ml de amortiguador MOPS 12X (MOPS 0.24M, acetato de sodio 0.06M y EDTA-Na₄ 0.012M) y 16.25 ml de formaldehído 37% precalentado a 65°C. La solución se mezcló y vació sobre el molde del gel. Se utilizó como amortiguador de corrida MOPS 1X.

Para la preparación de las muestras se tomaron 10 µg de RNA total y se llevaron a un volumen final de 25 µl con H₂O. Se adicionó 23 µl de solución desnaturizante (formamida al 50%, amortiguador MOPS 1X y formaldehído 2M) y 3 µl de solución colorante (azul de bromocresol 0.25%, xilen-cianol 0.25% y glicerol 40%), mezclando perfectamente. Cada muestra se desnaturizó a 65°C por 5 min y 1 min en hielo. Las muestras se cargaron al gel, aplicando una corriente de 10 mA de 16-18 h.

4)Transferencia del RNA

El RNA total separado por electroforesis, se transfirió del gel a un soporte sólido; membranas de nylon, reportado por Khandjian (129). El protocolo que se empleó para la transferencia fue el siguiente:

Se prepararon el sistema de transferencia por capilaridad y la solución SSC 20X pH 7 (NaCl 3M y citrato de sodio 0.3M). Sobre la placa de vidrio se colocó una tira de papel filtro (Whatman #1) de 16 x 26 cm prehumedecido en SSC 10X, y encima de éste el gel de agarosa invertido, inmediatamente después la membrana de Nytran (Schleicher & Schuell), dos papeles filtro (Whatman #1) cortados con las mismas dimensiones del gel y preequilibrados con solución SSC 2X. La superficie de la membrana de nylon se alisó con un tubo para evitar posibles burbujas de aire. A continuación se apiló una torre de papel absorbente, una placa de vidrio y un peso de 200-300 g. La transferencia se realizó toda la noche. Al día siguiente la membrana se retiró y lavó con SSC 2X, secandola entre papel filtro. Se realizó la fijación del RNA total a la membrana con hornado a 80°C por 60 min.

5) Hibridación de tipo Northern

El protocolo de la hibridación del tipo Northern (RNA-DNA) se llevó a cabo de la siguiente manera:

La membrana de nylon se colocó dentro de una bolsa de plástico, agregando amortiguador de prehibridación (50% de formamida, SSC 5X, solución Denhardt 5X, fosfato de sodio 50mM pH 6.5, SDS 0.1% y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón. La solución Denhardt 100X se preparó con 2 g de ficoll-4000, 2 g de polivinilpirrolidona y 2 g de albúmina bovina).

Las burbujas se eliminaron de la bolsa y después se selló. El periodo de incubación duró de 2 a 18 h a 42°C.

Concluido el tiempo de prehibridación el amortiguador se descartó, adicionando en su lugar la mezcla de hibridación. La cual se preparó con amortiguador de hibridación (50% de formamida, SSC 5X, fosfato de sodio 50mM pH 6.5 y solución Denhardt 1X), más la sonda marcada con ³²P y 400 µg/ml de DNA de esperma de salmón, previamente desnaturalizados por calentamiento a ebullición durante 5 min y en hielo 1 min. Por último, la mezcla anterior, se combinó con 4 ml de dextran sulfato al 50%. Nuevamente, se eliminó cualquier presencia de burbujas de aire y se reselló la bolsa. La hibridación se llevó a cabo durante 16 a 20 h a 42°C.

6) Lavados de las membranas

Concluido el tiempo establecido en la hibridación, la membrana se removió de la bolsa, para ser lavada por alguno de los dos métodos:

La membrana hibridada con las sondas de FCDP-B y con la de FCDP-A, se lavó 3 veces con SSC 2X/SDS 0.1% durante 5 min a TA, seguido de 2 lavados con SSC 0.25X/SDS 0.1% durante 15 min a 42° C y uno con SSC 0.1X/SDS 0.1% durante 15 min a 55°C.

La membrana hibridada con la sonda del GAPDH, se lavó 3 veces con SSC 2X/SDS 0.1% durante 5 min a 42°C, seguido de 2 lavados con SSC 0.25X/SDS 0.1% durante 15 min a 55°C y uno con SSC 0.1X/SDS 0.1% durante 15 min a 65°C.

Por último, las membranas se lavaron con SSC 2X, removiendo el exceso de SDS. Cada membrana se secó con papel filtro y se envolvió con Kleen-Pack, procurando dejar una superficie alisada. La membrana, una vez envuelta, se expuso a una placa de rayos X (Cronex, Du Pont) entre dos pantalla intensificadoras. El tiempo de exposición varió de 2-15 días a -70°C.

En el revelado, la placa de rayos X se sumergió en la solución reveladora (GBX, Kodak) durante 5 min, después de lo cual se enjuagó con abundante agua y la placa se pasó a la solución fijadora (GBX, Kodak) donde estuvo de 3 -5 min. El exceso de fijador se lavó con abundante agua.

IV. ENSAYO DE ACTIVIDAD MITOGENICA

La presencia de actividad biológica de FCDP se analizó en los medios condicionados obtenidos de fibroblastos de pulmón humano, valorando la actividad mitogénica por la estimulación de la síntesis del DNA y, por lo tanto, la incorporación de timidina-³H, en las células blanco; BALB/c3T3 (130). Dicha clona está disponible comercialmente (ATCC), y para su crecimiento se utilizó medio DMEM (Medio Eagle Modificación Dulbecco) y 10% de suero de ternera (Gibco, BRL).

1) Concentración de los Medios Condicionados.

De los medios condicionados colectados de los fibroblastos de pulmón humano, se seleccionaron los provenientes de: CCD11-Lu p=7, LL-29 p=12, U2-OS p=5 y HIPF-13 p=3.

El protocolo que se utilizó para la preparación del medio condicionado fue el siguiente:

Un volumen de 5 - 10 ml de MC se llevó a 0.2% con albúmina bovina (Sigma), centrifugando a 2500 rpm de 15-20 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante se liofilizó toda la noche. Después de lo cual, el liofilizado se reconstituyó en 1/10 del volumen original con H₂O desionizada y se dializó en membranas de 3500 mw (Spectra/Por 4), contra PBS a 4°C durante 48-72 h.

2) Preparación del Plasma Pobre en Plaquetas (PPP)

El plasma se obtuvo del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y se procesó según Bauman y col. (131). El protocolo fue el siguiente:

El plasma se centrifugó a 2500 rpm 30 min, se descartó el precipitado y el sobrenadante se dializó en membranas de 3500 mw (Spectra/Por 4) contra PBS a 4 °C durante 72 h. Nuevamente, se centrifugó a 20 000 rpm. El sobrenadante se fraccionó en alícuotas y almacenó a -20°C hasta que fue usado. Se preparó una solución de PPP al 5% con DMEM.

3) Preparación del anticuerpo anti-FCDP

Se empleó un anticuerpo anti-FCDP (IgG, R&D systems) humano preparado en conejos. El anticuerpo se resuspendió en PBS hasta obtener una concentración de 1mg/ml. Se utilizaron 40 y 200 µg/ml del anticuerpo (Tabla 2), incubados a volúmenes iguales con 50 µl del MC y la precipitación se realizó a 4°C durante 24 h. El sobrenadante se removió cuidadosamente del precipitado, después de centrifugar la muestra a 13 000 rpm 5 min.

4) Incorporación de Timidina-³H en DNA de células BALB/c3T3

En la determinación de la actividad similar al FCDP-B se utilizó DMEM suplementado con PPP al 5 % y alícuotas de 10, 25 y 50 µl del MC de las líneas seleccionadas. Adicionalmente, 50 µl del medio experimental se incubaron con anticuerpo anti-FCDP (ver Preparación del anticuerpo). También se emplearon muestras de control positivo que contenían 1, 5 y 10% de suero de ternera, así como controles negativos consistentes en medio libre de suero (Tabla 2). En términos generales el protocolo que se utilizó para la incorporación de timidina-³H fue el siguiente:

Se incubaron dos cajas de 25 cm² con células blanco BALB/c3T3. Una vez alcanzada la confluencia la monocapa se dispersó enzimáticamente con tripsina 0.25% y EDTA 0.01%, resuspendiendo con 20 ml de DMEM/10% suero. Se sembró una alícuota de 200 µl de la suspensión celular en pozos de microtitulación de 0.3 cm², incubando a 37°C en humedad con atmósfera de 95% O₂/5% CO₂. El medio se removió y la capa celular se lavó 2 veces con PBS, adicionando las muestras experimentales indicadas en la Tabla 2. De inmediato, las muestras se incubaron ±18 h a 37°C. Después de lo cual, se adicionó timidina-³H (5µCi/ml; 6.7 Ci/mmol. Du Pont, NEN Research Products), incubando por seis horas más. Terminado el tiempo de incubación, el medio se removió completamente, lavando cada pozo 1 vez con PBS a 4°C. A continuación, las células se fijaron con 200 µl de ácido tricloroacético al 10%. La solución ácida se descartó, lavando la capa remanente 2 veces con agua destilada y descartando cada lavado. Por último, las células se solubilizaron con 300 µl de SDS al 1%, pasando la radiactividad insoluble en ácido a un vial de centelleo,

que contenía 10 ml de solución Bray. La cantidad de timidina-³H incorporada se midió en el Contador de Centelleo Líquido.

Tabla 2. Incorporación de Timidina-³H.

Muestra	Suero de ternera	PPP 5 %	Medio Condicionado (μl)	Anticuerpo anti-FCD (μg/ml)
1	-	-	-	-
2	-	+	-	-
3	1%	-	-	-
4	5%	-	-	-
5	10%	-	-	-
CCD 11-Lu				
6	-	+	10	-
7	-	+	25	-
8	-	+	50	-
9	-	+	50	-
10	-	+	50	250
U2-OS				
11	-	+	10	-
12	-	+	25	-
13	-	+	50	-
14	-	+	50	-
15	-	+	50	150
HIPF-13				
16	-	+	10	-
17	-	+	25	-
18	-	+	50	-
19	-	+	50	-
20	-	+	50	-

Cada muestra experimental se corrió por triplicado.

5) Análisis estadístico

En el bioensayo de la actividad metabólica, la significancia estadística se determinó por ANOVA con la prueba "Post Hoc". Para la comparación de 2 grupos se usó la prueba "t student" para grupos independientes.

RESULTADOS

El presente trabajo fue diseñado para probar el potencial de los fibroblastos de pulmón humano para producir el FCDP y determinar si se mostraban diferencias de producción entre los fibroblastos derivados de pulmón normal y fibrótico.

Para ello, se siguieron dos estrategias: 1) La determinación de la presencia del o los mensajeros del FCDP cadena A y B, mediante la hibridación tipo northern. Para este propósito, el RNA total fue aislado de fibroblastos de pulmón humano normal o de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y separado en geles desnaturalizantes de formaldehído. Para la transferencia del RNA total, fueron utilizadas membranas de nylon. La hibridación fue realizada con el fragmento de 2 kb del cDNA del c-sis (clona pSM-1) y con el fragmento de 1.3 kb del FCDP-A (clona pUC-13-D1). Además, fue incluido el RNA total de la línea U2-OS (osteosarcoma) por ser productora del FCDP, cadena A y B, la cual se utilizó como control positivo. Otro control empleado para determinar los niveles de carga del RNA total entre las líneas celulares, consistió en rehibridar las membranas con el fragmento de 750 pb del cDNA del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

2) La evaluación proteica del FCDP, la cual fue probada en los medios condicionados (MC) provenientes de fibroblastos de pulmón humano, mediante el bioensayo estándar en células BALB/c3T3, midiendo el incremento en la incorporación de timidina-³H al DNA. Para evaluar la especificidad de este ensayo se usó, en experimentos paralelos el anticuerpo anti-FCDP.

I. OBTENCION DE LA SONDA DE cDNA

A) La cuantificación espectrofotométrica del DNA plasmídico de pSM-1 o pHeGAP, amplificados por el método de lisis alcalina y purificados con extracciones fenol/CHCl₃, se muestra en la Tabla 3, donde 1 DO (densidad óptica) es equivalente a 40 µg del DNA.

Tabla 3. Rendimiento del DNA plasmídico

Plásmido	DO	Concentración	Total
	260 nm	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	μl
pSM-1	0.399	9.8	500
pHcGAP	0.044	2.2	40
PDGF-A	0.09	3.6	50

La técnica utilizada para la amplificación de los 3 plásmidos fue la misma, excepto que el volumen utilizado para la clona pSM-1 fue cuatro veces mayor.

B) La digestión de pSM-1 con la enzima de restricción Bam HI produjo 3 fragmentos: de 2.7, 2 y 0.63 kb, respectivamente. El segmento de 2.7 kb representa el vector, el fragmento de 2 kb al cDNA del FCDP, el cual fue purificado a partir del gel de agarosa. El último fragmento contiene también parte del cDNA del FCDP. Asimismo, fueron purificados los fragmentos de 1.3 kb y 759 pb, que corresponden al gen del FCDP cadena A y al gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, respectivamente.

C) La separación electroforética de la clona pSM-1 con o sin digestión fue realizada en el gel de agarosa al 1% (Fig. 2). En general, el plásmido sin digestión enzimática, presenta diferentes grados de enrollamiento y por lo tanto de movilidad electroforética. De esta manera, podemos detectar la forma superenrollada, circular cerrada y diversas formas multiméricas (Fig.2 carril 2). En contraste, el plásmido digerido con Bam HI genera 3 fragmentos únicos, pudiendo determinar el peso molecular de cada banda, por comparación con λ DNA, digerido con EcoRI y Hind III. (Fig. 2 carriles 3 y 1, respectivamente). Para determinar la eficiencia y rendimiento del proceso de purificación del fragmento de 2 kb, que correspondía a el cDNA del FCDP-B más un segmento del extremo 5' del vector, se corrió en el gel una alícuota del inserto (Fig. 2 carril 4).

D) Los insertos de cDNA de 2 kb (FCDP-B), 1.3 kb (FCDP-A) y 750 pb (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) fueron marcados radiactivamente con dCTP- α ^{32}P (6000 Ci/mmol de actividad específica en la fecha de calibración).



Fig. 2 Separación electroforética.

- 1) Lambda DNA digerido con Eco RI/Hind III, 2) Plásmido pSM-1 sin digerir
 3) pSM-1 digerido con Bam HI, 4) Inserto de 2 kb del FCDP-B.

II. OBTENCION DEL RNA TOTAL.

A) Las líneas de fibroblastos de pulmón humano, se cultivaron en cajas de 75 cm², y cuando alcanzaron confluencia se procedió a la extracción de RNA total (Tabla 4).

B) El rendimiento de la extracción del RNA total y la proporción RNA/proteínas en cada muestra, se determinaron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260/280 nm. (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento del RNA total.

Línea Celular	DO 260 nm	Proporción 260/280	RNA total (µg)
NA p=5	0.133	2.10	79
N2 p=6	0.065	1.91	22
LL-24 p=9	0.069	1.97	41
CCD11-Lu p=7	0.142	1.91	57
LL-29 p=8	0.048	1.99	45
HIPP-8 p=4	0.056	1.90	22
HIPP-13 p=1	0.036	1.80	25
HIPP-19 p=3	0.037	1.90	52

Las cuatro primeras líneas celulares son normales, las restantes son fibróticas. La letra p indica el pasaje de cultivo al momento de realizar la extracción del RNA total.

C) Se llevó a cabo la separación electroforética de 10 µg de RNA total por línea celular, en geles desnaturalizantes de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. Las bandas fueron visualizadas por la exposición del gel a través del transiluminador UV, donde sólo fue posible apreciar las bandas de los RNA ribosomales, 28S y 18S. La definición de las bandas ribosomales mostró que la extracción del RNA total estaba libre de degradación, por lo que se transfirió al soporte sólido (Fig. 3).

D) En el análisis de la hibridación tipo northern para el RNAm del FCDP-B, se demostró después de tiempos largos de exposición de la placa autorradiográfica (2 semanas) que los fibroblastos de pulmón humano expresaban bajos niveles de un transcrito de 2.8 kb. No se observaron diferencias de expresión entre las líneas celulares derivadas de pulmón normal o fibrótico. El RNAm de 2.8 kb, fue observado como una banda menor en la línea U2-OS, la cual expresa predominantemente el transcrito de 4 kb. Este último transcrito también fue observado en algunas líneas de fibroblastos. La rehibridación de las membranas con el cDNA para GAPDH, muestra que la diferencia en la expresión del FCDP-B, no se debe a variaciones en la cantidad del RNA colocado por carril (Fig. 4).

E) La expresión del RNAm del FCDP-A no se detectó con el análisis de la hibridación tipo northern.

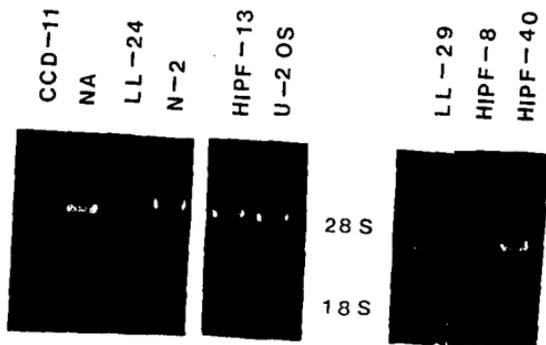


Fig. 3 Separación electroforética del RNA total

Una vez confluentes en cajas de 75 cm² las líneas celulares, fueron sometidas a la extracción del RNA total, utilizando el método de isotiocianato del paso único. Las membranas fueron preparadas con 10 µg de RNA total por carril.

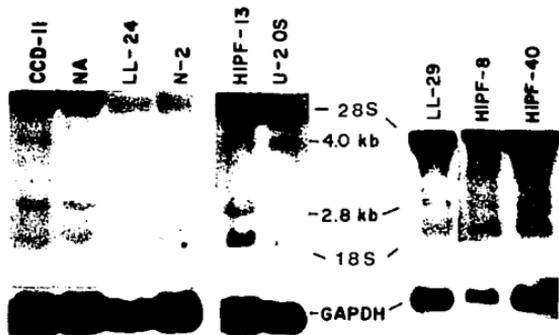


Fig. 4 Hibridación del tipo Northern.

El RNA total fue hibridado con el cDNA del FCDP-B, marcado con dCTP(³²P). Las líneas de pulmón normal son: CCD 11-Lu, NA, LL-24 y N2. Las fibróticas son: LL-29, HIPF-8, HIPF-13 y HIPF-40. La línea U2-OS fue usada como control positivo. Las autoradiografías fueron expuestas 2 semanas a -70°C. La parte inferior muestra el nivel de RNAm del GAPDH, usado para monitorear la cantidad del RNA total en cada carril.

III. ACTIVIDAD MITOGENICA.

La incorporación de timidina-³H en el DNA de las células blanco BALB/c3T3, fue evaluada primeramente con 3 concentraciones diferentes de suero de ternera: 1, 5 y 10%. La incorporación de timidina tritiada se incrementó proporcionalmente en relación al porcentaje de suero utilizado (Fig.5).

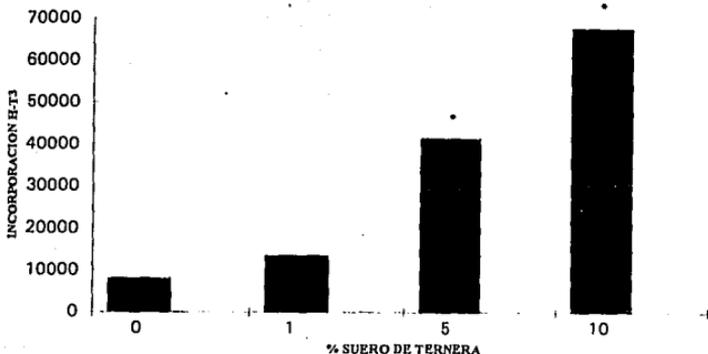


Fig. 5 Curva Dosis-Respuesta.

La incorporación de T-³H al DNA de la línea celular BALB/c3T3 se incrementó al aumentar la concentración del suero de ternera. Cada muestra fue corrida por triplicado. La población celular utilizada fue de 10⁴ células/pozo. * En estas muestras la varianza resulto singnificativa comparada por medio de ji-cuadrada con el grupo cero.

Asimismo, la adición de 10, 25 y 50 μ l del MC provenientes de los fibroblastos de pulmón humano normal; CCD11-Lu, y fibróticos; LL-29 y HIPF-13, produjo un incremento en la incorporación de timidina tritiada que fue significativo con las dosis mayores del MC. Al comparar la dosis de 50 μ l del MC de las líneas celulares con las muestras control, se produjo el incremento mayor de incorporación de timidina, obteniendo los porcentajes siguientes: 148 (CCD11-Lu), 115 (LL-29) y 101% (HIPF-13) (Fig. 6).

Por otro lado, la incorporación de T-³H fue inhibida del 56 al 80%, al utilizar la alícuota de 50 μ l del MC más el antisuero anti-FCDP (Tabla 5).

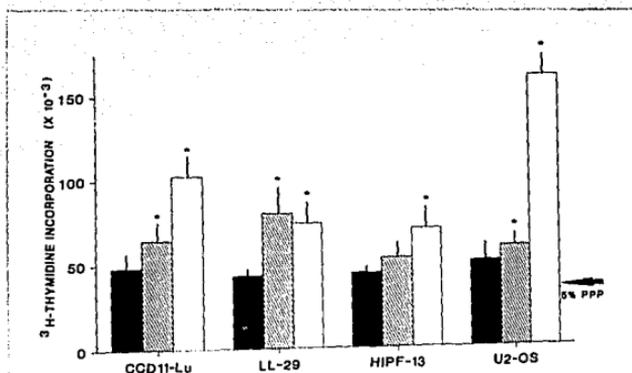


Fig 6 Incorporación de Timidina-³H

La línea BALB /c3T3 creció en medio DMEM/5% PPP. Las alícuotas de MC con: 10 μ l (barras negras), 25 μ l (barras cruzadas) y 50 μ l (barras blancas). Fueron utilizados MC provenientes de CCD11-Lu (pulmón normal), LL-29 y HIPF-13 (de pulmón con FPI) y U2-OS (osteosarcoma). La flecha indica el control con PPP 5%. Los resultados representan la media de la desviación estándar, determinada en las muestras por triplicado. * Indica las diferencias estadísticamente significativas, por comparación con el control de PPP 5% ($P < 0.01$).

Tabla 5. Anticuerpo anti-FCDP

Línea celular	MC μl	Anticuerpo μg/ml	Incorporación %
CCD11-Lu	50	-	100
	50	250	19
U2-OS	50	-	100
	50	150	44

Se utilizaron sólo dos líneas en el ensayo por carecer de más anticuerpo anti-FCDP.

DISCUSION

La regulación de la proliferación celular durante la remodelación del tejido es un proceso complejo, mediado a través de controles positivos y negativos.

En los últimos años, la atención ha sido enfocada hacia un conjunto de citocinas conocidas como factores de crecimiento, involucrados en la división celular y modulación del fenotipo celular. En este sentido, el FCDP representa una de las citocinas más importantes para las células de origen mesenquimatoso, dada su potente actividad mitogénica sobre esta estirpe celular.

Diversos estudios han demostrado que los eventos intracelulares iniciales provocados por el FCDP, consisten en promover la transición de la fase G0/G1, requisito indispensable para la acción mitogénica de otro grupo de citocinas, llamadas factores de progresión (60), entre los que se encuentran el factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento semejante a insulina entre otros.

Hace algunos años, la hipótesis dominante en relación a la replicación de fibroblastos era la de la vía parácrina. De acuerdo a esta hipótesis se consideraba que los fibroblastos eran células blanco de factores de crecimiento como el FCDP, el cual eran producido por células inflamatorias, en especial los macrófagos alveolares, los que eran responsables de la estimulación parácrina de la fibroproliferación. Sin embargo, diversas evidencias experimentales recientes han sugerido que los propios fibroblastos pueden participar como células efectoras activas, dirigiendo la respuesta celular tanto propia como de otras células, a través de la elaboración de diferentes citocinas. Algunas de estas moléculas producidas por fibroblastos de pulmón incluyen: interleucina-6 (12) y factor colonial estimulante de granulocitos-macrófagos (11). Asimismo, se ha demostrado la expresión del FCDP-A por células mesenquimales. En este contexto, Fabisiak y cols.(14) observaron que fibroblastos derivados de pulmón de rata expresaban espontáneamente el RNAm de la cadena A del FCDP. En otro tipo de estudios, se ha podido inducir la expresión genética y proteica del FCDP-A en los fibroblastos, por la acción de diversas citocinas como: factor de crecimiento transformante beta, factor de necrosis tumoral, interleucina-1 y el mismo FCDP (132-135). En conjunto, estas evidencias sugieren que el FCDP puede ser expresado por fibroblastos ya

sea de manera espontánea o inducida, y por lo tanto podría desempeñar un papel en la regulación autócrina y/o parácrina de las funciones de estas células (132,133,136).

En cuanto a la expresión del FCDP-B, del mensajero c-sis ha sido encontrado en los fibroblastos dérmicos de porcino, después de un daño cutáneo (110). De manera interesante, la molécula del FCDP en porcinos esta formada del homodímero BB (137). También ha sido demostrada la expresión del FCDP-B, en fibroblastos de embrión de ratón por la inducción del factor de crecimiento transformante beta (82). Sin embargo a la fecha, la expresión del c-sis/PDGF-B por fibroblastos de pulmón humano no había sido demostrada.

A principios de los ochenta, el único mensajero del FCDP-B buscado y reportado en la literatura fue el de 3.8/4.2 kb. Inicialmente y apoyados con la técnica de hibridación tipo Northern, nosotros también buscamos este mensajero, pero detectamos otra banda de tamaño menor (2.8 kb) que era hibridada con la misma sonda. La presencia de la banda podría deberse a una hibridación inespecífica o representar otro mensajero del FCDP-B. Interesados en este hecho, iniciamos la "caza" de información sobre la banda pequeña. El primer indicio alentador fue encontrado en el reporte de Mornex y col. (108), quienes obtuvieron el RNAm de 4.2 kb y, lo que ellos llamaron, "una banda tenue de 2.6 kb" del RNAm en macrófagos alveolares, curiosamente derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. En este trabajo no hubo mayor discusión acerca de la banda pequeña, sin embargo, a partir de aquí empezamos a encontrar otros reportes en los que se hablaba del RNAm de 2.6 kb, aunque de una manera igualmente escueta (138, 139, 140). Finalmente llegamos al término del camino, la banda de 2.8 kb efectivamente era otro RNAm del c-sis, más aún, ya había sido caracterizado en otros sistemas celulares (84, 91, 104).

Sorprendentemente, la diferencia aproximada de 1 kb entre ambos mensajeros del c-sis: 3.8/4.2 y 2.8 kb se debe a diferencias en la región del extremo 5' del gen. Esta región posee segmentos ricos en secuencias GC, implicadas en inhibir la eficiencia traduccional de mensajeros, hecho demostrado por estudios realizados *in vitro* (91) y utilizando la técnica del gen reportero (84).

En la caracterización del extremo 5' se encontró que el transcrito de 2.8 kb retiene 80 nt de los 1088 nt establecidos en el primer exón, por lo tanto, este RNAm carece del efecto inhibidor de la traducción. De esta manera, se ha determinado al menos en células endoteliales, que aunque el nivel de expresión del RNAm de 2.8 kb sea tan bajo como 2-3% respecto al transcrito completo, puede ser relacionado con un nivel mayor síntesis de proteína del FCDP-B (104).

Con el hallazgo anterior, nuestros resultados demostraron que casi todos los fibroblastos de pulmón humano, tanto normal como fibrótico, expresan el mensajero de 2.8 kb del c-sis. El RNAm de 3.8/4 kb fue expresado ocasionalmente en algunas de las líneas celulares estudiadas.

Además, con los experimentos de incorporación de timidina tritiada al DNA de las células BALB/c3T3 se demostró la presencia en los medios condicionados, obtenidos de fibroblastos pulmón humano, actividad estimuladora del crecimiento, sugiriendo que el RNAm del FCDP-B es traducido a proteína. Los MC incrementaron la incorporación del radioisótopo, la cual fue significativamente disminuida por el anticuerpo anti-FCDP.

Tomando en consideración que casi todas las líneas celulares examinadas expresaron espontáneamente el mensajero de 2.8 kb y actividad promotora del crecimiento, sin diferencias aparentes entre los fibroblastos normales o fibróticos, resulta obvio que nuestra hipótesis es refutada, aunque es importante resaltar que nuestros hallazgos proponen al FCDP-B como una citocina involucrada en la fibroproliferación, actuando autócrinamente. Además, es importante establecer las fuentes celulares productoras del FCDP-B en el pulmón. En cuanto al significado biológico del FCDP-B, es posible sugerir que este factor de crecimiento podría desempeñar un papel en la regulación fisiológica de la proliferación de los fibroblastos pulmonares humanos.

En cuanto a la búsqueda de posibles diferencias entre los fibroblastos normales y fibróticos, podrían ser planteadas dos líneas de investigación. Primero, considerar la interrelación existente entre los fibroblastos y otras estirpes celulares establecidas en el pulmón. Siguiendo esta línea de investigación, podría ser estudiado el co-cultivo de macrófagos alveolares y fibroblastos, ambas líneas derivadas de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI), y como se sabe productoras del RNAm de 2.8 kb. En este sentido resultaría interesante encontrar niveles mayores de actividad promotora del crecimiento en estos MC, que cuando fueran utilizados fibroblastos normales en co-cultivo.

Obviamente, la actividad sobre el crecimiento deberá ser abolida por el anticuerpo anti FCDP-B. Segundo, establecer el efecto de otras citocinas, ya que se sabe que la combinación de éstas puede provocar reacciones antagónicas o potenciadoras, dependiendo de las citocinas específicas y de la estirpe celular involucrada. Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante-beta (FCT- β) puede estimular la proliferación de fibroblastos en presencia del FCDP, pero inhibe el crecimiento cuando el factor de crecimiento epidérmico está presente (4). Por otro lado, mediante estudios cinéticos se sabe que la adición del FCT- β a células embrionicas de ratón, induce en 20 min la expresión del RNAm del FCDP-B (82). Además, el FCT- β incrementa la transcripción de genes de colágena y fibronectina, dando como resultado el aumento en la cantidad de proteínas de la matriz extracelular (141, 142). Por lo anterior, resultaría clave investigar la actividad del FCT- β en los medios condicionados de fibroblastos de pacientes normales y con fibrosis, ya que el depósito exagerado de colágenas intersticiales es característico de la fibrosis pulmonar difusa (15).

Por otro lado, en este estudio no se encontró el RNAm del FCDP-A. Esto podría deberse a que esta cadena no es expresada espontáneamente en los fibroblastos pulmonares humanos, o a que la cantidad de mensajero está por debajo de los límites de sensibilidad del análisis de la hibridación tipo northern. Alternativamente, podría ser aplicada otra técnica muchísimo más sensible, como es el caso del PCR (reacción en cadena de la polimerasa), si se cuenta con los recursos para realizarla.

En conclusión, nuestros datos indican que los fibroblastos derivados de pulmón humano normal y fibrótico, expresan *in vitro*, un transcrito de 2.8 kb y ocasionalmente el transcrito de 4.0 kb de la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Además produce una proteína con actividad de FCDP que induce la incorporación de timidina tritiada en el DNA de células BALB/c3T3.

REFERENCIAS

1. Tovey M.G. 1988. The expression of cytokines in the organs of normal individuals: role in homeostasis. A review. *J. Biol. Reg. Homeo. Agents.* 2:87-92.
2. Kelley J., W. S. Stirewalt, L. Chrin. 1985. Protein synthesis in rat lung: measurements *in vivo* based on leucyl-tRNA and rapidly turning-over procollagen I. *Biochem. J.* 222: 77-83.
3. Kovacs E. J. 1991. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol. Today.* 12:17-22.
4. Kelley J. 1990. State of the art. Cytokines of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:765-788.
5. Carrel A. 1922. Growth-promoting function of leucocytes. *J. Exp. Med.* 35:385-391.
6. Adamson E. D. 1993. Growth factors and their receptors in development. *Develop. Genet.* 143: 159-164.
7. Sporn M. D., G. J. Todaro. 1980. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.* 303: 878-880.
8. Fabisiak J., J. N. Evans, J. Kelly. 1989. Increased expression of PDGF-B (c-sis) mRNA in lung precedes DNA synthesis and tissue repair during chronic hyperoxia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1: 181-189.
9. Yamauchi K., Y. Martinet, P. Basset, G. A. Fells, R. G. Crystal. 1988. High level of transforming growth factor- β are present in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137:1360-1363.
10. Bochner B. S., S. D. Landy, M. Plaut, C. A. Dinarello, R. P. Schleimer. 1987. Interleukin 1 production by human lung tissue. I. Identification and characterization. *J. Immunol.* 139:2297-2302.
11. Vancheri C., J. Gaudie, J. Bienenstock, G. Cox, R. Scicchitano, A. Stanisz, M. Jordana. 1989. Human lung fibroblast derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) mediates eosinophil survival *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1:289-295.

12. Elias J. A., G. Trinchieri, J. M. Beck, P. L. Simon, P. B. Sehgal, L. T. May, J. A. Kern. 1989. A synergistic interaction of Il-6 and Il-1 mediates the tymphocyte-stimulating activity produced by recombinant Il-1-stimulated fibroblast. *J. Immunol.* 142:509-514.
13. Stiles A. D., B. M. Moats-Staats. 1989. Production and action of insuline-like growth factor I/somatomedin C in primary cultures of fetal lung fibroblast. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1:21-26.
14. Fabisiak J. P., M. Absher, J. N. Evans, J. Kelly. 1992. Spontaneous production of PDGF A-chain monodimer by rat lung fibroblast *in vitro*. *Am. J. Physiol.* 263 (Lung Cell. Mol. Physiol.) 7:L185-L193.
15. Colby T. V., A. C. Churg. 1986. Patterns of pulmonary fibrosis. *Pathol. Anuv.* 21:277-309.
16. Bitterman P. B., C. A. Henke. 1991. Fibroproliferative disorders. *Chest.* 99:81-84.
17. Seyer J. M., E. T. Hutcheson, A. H. Kang. 1976. Collagen polymorphism in idiopathic chronic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 57:1498-1507.
18. Clark J. G., J. E. Overton, B. A. Marino, J. Vitto, B. C. Starcher. 1980. Collagen biosynthesis in bleomycin-induce pulmonary fibrosis in hamster. *J. Lab. Clin. Med.* 96:943-953.
19. Clark J. G., C. Kuhn, J. A. McDonald, R. P. Mecham. 1983. Lung connective tissue. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 10:249-331.
20. Pardo A., M. Selman. 1991. The collagenase gene family: relationships between collagenolytic activity and fibrogenesis. In: *Interstitial Pulmonary Diseases: Selected Topics*. M. Selman, R. Barrios, eds. CRC Press Boca Raton. Ann Arbor, Boston. 84-91p.
21. Crystal R. G., J. E. Gadek, V. J. Ferrans, B. R. Line, G. W. Hunninghake. 1981. *Interstitial lung diseases: current concepts of pathogenesis, staging and therapy.* *Am. J. Med.* 70:542-568.
22. Crystal R. G. 1987. *Interstitial lung disorders.* In *Principles of Internal Medicine*. 11th ed. E. Braunwald et al., editors. McGraw-Hill Book Co., New York. 1095-1105.
23. Selman M., M. Montañó, C. Ramos, R. Chapela. 1986. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 41:355-359.
24. Absher M. Fibroblast. In: *Lung Cell Biology*, edited by D. Massaro. New York: Dekker. 1989. vol. 41, chapt. 8, p 401-439. (Lung Biol. Health Dis. Ser.)

25. Raghu G., Y. Chen, V. Rush, P. S. Rabinovich. 1988. Differential proliferation of fibroblast culture from normal and fibrotic human lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:703-708.
26. Jordana M., J. Schulman, C. McSharry, L.B. Irving, M. T. Newhouse, G. Jordana, J. Gaudie. 1988. Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblast from control and fibrotic lung tissue. *Am. Rev. Resp. Dis.* 137:579-584.
27. Ross R., J. A. Glomset. 1973. Atherosclerosis and arterial smooth muscle cell. *Science.* 180: 1332-1339.
28. Ross R., J. A. Glomset. 1976. The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 295:369-377 and 420-425.
29. Ross R., J. A. Glomset, B. Kariya, L. Harker. 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates of arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:1207-1210.
30. Barret T. B., E. P. Benditt. 1988. Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2810-2814.
31. Libby P., S. J. C. Warner, R. N. Salomon, L. K. Birinyi. 1988. Production of platelet-growth factor-like mitogen by smooth muscle cells from human atheroma. *N. Engl. J. Med.* 318: 1493-1498.
32. Balk S. D. 1971. Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not at transformed, chicken fibroblast in a plasma-containing medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68:271-275.
33. Balk S. D., J. F. Whitefield, T. Youdale, A. C. Braun. 1973. Roles of calcium, serum, plasma, and folic acid in the control of proliferation of normal and Rous sarcoma virus-infected chicken fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 675-679.
34. Kohler N., A. Lipton. 1974. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp. Cell Res.* 87:297-301.
35. Ross R. 1989. Peptide Regulatory Factors. Platelet-derived growth factor. *The Lancet* 27:1179-1182.
36. Betsholtz C., A. Johson, C-H. Heldin, B. Westermark. P. Lind, M. S. Urdea, R. Eddy, T. B. Shows, K. Philpott, A. L. Mellor, T. J. Knott, J. Scott. 1986. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature (London)* 320:695-699.

37. Dalla-Favera R., C. Gallo, A. Giallongo, C. M. Croce. 1982. Chromosomal localization of the human homolog (c-sis) of the simian sarcoma virus onc gene. *Science*. 218:686-688.
38. Swan D. C., O. W. McBride, K. C. Robbins, D. A. Keithley, E. P. Reddy, S. A. Aaronson. 1982. Chromosomal mapping of the simian sarcoma virus onc gene analogue in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:4691-4695.
39. Devare S. G., E. P. Reddy, J. D. Law, K. C. Robbins, S. A. Aaronson. 1983. Nucleotide sequence of the simian sarcoma genome: demonstration that its acquired cellular sequence encode the transforming gene product p28 sis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80:731-735.
40. Doolittle R. F., M. W. Hunkapiller, L. E. Hood, S. G. Devare, K. C. Robbins, S. A. Aaronson, H. N. Antoniades. 1983. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science*. 221: 275-277.
41. Waterfield M. D., G. T. Scrace, N. Whittle, P. Stroobant, A. Johnson. 1983. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28 sis of simian sarcoma virus. *Nature*. 304: 35-39.
42. Bywater M., F. Rorsman, E. Bongram-Rudloff, G. Mark, A. Hammacher, C-H. Heldin, B. Westmark, C. Betsholtz. 1988. Expression of recombinant platelet-growth factor A- B-chain homodimers in rat-1 cells and human fibroblast reveals difference in protein processing and autocrine effects. *Mol. and Cell Biol*. 8: 2753-2762.
43. Robbins K. C., H. N. Antoniades, S. G. Devare, M. W. Hunkapiller, A. S. Aaronson. 1983. Structural and immunological similarities between sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. *Nature*. 305:605-608.
44. Owen A. J., P. Pantazis, H. N. Antoniades. 1984. Simian sarcoma virus-transformed cells secrete a mitogen identical to platelet-derived growth factor. *Science* 225:54-56.
45. Josephs S. F., C. Guo, L. Ratner, F. Wong-Staal. 1984. Human proto-oncogene nucleotide sequence corresponding to the transforming region of simian sarcoma virus. *Science*. 223:487-491.
46. Johnson A., C-H. Heldin, A. Wasteson, B. Westmark, T. F. Deuel, J. S. Huang, P. H. Seeburg, A. Gray, A. Ullrich, G. Scrace, P. Stroobant, M.D. Waterfield. 1984. The c-sis gene encodes a precursor of the B-chain of platelet-derived growth factor. *EMBO. J*. 3:921-928.

47. Antoniades H. N. 1981. Human platelet-derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 7314-7317.
48. Heldin C-H., B. Westermark, A. Wasteson. 1981. Specific receptors for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3664-3668.
49. Yarden Y., J. A. Escobedo, W. J. Kuang, T. L. Yang-Feng, T. O. Daniel, P. M. Trembel, E. Y. Chen, M. E. Ando, R. N. Harkins, U. Francke, V. A. Fried, A. Ullrich, L. T. Williams. 1986. Structure of the receptor for the platelet-derived growth factor helps define a family closely related growth factor receptors. *Nature.* 323: 226-232.
50. Hart C. E., R. A. Seifert, R. Ross, D. F. Bowen-Pope. 1987. Synthesis, phosphorylation, and degradation of the multiple forms of the platelet-derived growth factor receptor studied using a monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 262: 10780- 10785.
51. Gronwald R. G., F. J. Grant, B. A. Haldeman, C. E. Hart, P. J. O'Hara, F. S. Hage, D. F. Bowen-Pope, M. J. Murray. 1988. Cloning and expression of a cDNA coding for the human platelet-derived growth factor receptor: Evidence for more than one receptor class. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:3435-3439.
52. Hammacher A., K. Mellstrom, C-H. Heldin, B. Westermark. 1989. Isoform specific induction of actin reorganization by platelet-derived growth factor suggests that the functionally active receptor is a dimer. *EMBO J.* 8:2489-2495.
53. Seifert R. A., C. E. Hart, P. E. Phillips, J. W. Forstrom, R. Ross, M. J. Murray, D. F. Bowen-Pope. 1989. Two different subunits associate to create isoform specific platelet-growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 264:8771-8778.
54. Grotendorst G. R., A. Igarashi, R. Larson, Y. Soma, M. Charette. 1991. Differential binding, biological and Biochemical action of recombinant PDGF AA, AB and BB. *J. of Cell. Physiol.* 149:235-243.
55. Clark J. G., D. K. Madtes, G. Raghu. 1993. Effects of Platelet-derived growth factor isoforms on human lung fibroblast proliferation and procollagen gene expression. *Exp. Lung Res.* 19: 327-344.
56. Bowen-Pope D. F., R. A. Seifert, R. Ross. 1985. The platelet-derived growth factor receptor. In *Control of Animal Cell Proliferation.* A. L. Boyton and H. L. Leftert, eds. (New York: Academic Press), pp 281-312.

57. Stiles C. D. 1983. The molecular biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 33:653-655.
58. Ross R., E. W. Raines, D. F. Bowen-Pope. 1986. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46:155-169.
59. Deuel T. F. 1987. Polypeptide growth factor: roles in normal and abnormal cell growth. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 3: 443-492.
60. Pledger W. J., C. D. Stiles, H. N. Antoniades, C. D. Scher. 1977. Induction of DNA synthesis in BALB/c3T3 cells by serum components: Reevaluation of the commitent process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74:4481-4485.
61. Leof E. B., W. Wharton, J. J. Van Wyk, W. J. Pledger. 1982. Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulate G1 progression and competent BALB/c3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 141: 107-115.
62. Fabisiak P. J., J. Kelly. 1992. Platelet-derived growth factor. In: *Cytikines of the lung*. J. Kelly ed. M. Dekker Inc., New York. 3-39.
63. Rozengurt E., M. Rodriguez-Peña, K. A. Smith. 1983. Phorbol esters, phospholopase C. and growth factors rapidly stimulate the phosphorylation of a Mr 80,000 protein in intact quiescent 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 7244-7248.
64. Dicker P., E. Rozengurt. 1981. Phorbol ester stimulation of Na influx and Na-K pump activity in Swiss 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 433-441
65. Owen A. J., R. P. Geyer, H. N. Antoniades. 1982. Human platelet-derived growth factor stimulates amino acid transport and protein synthesis by human diploid fibroblast in plasma-free media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:3203-3207.
66. Westermark B., C-H. Heldin, B. Ek, A. Johnson, K. Mellstrom. 1983. Biochemistry and biology of platelet-derived growth factor. In: *Growth and Maturation Factors*, G. Guroff ed. pp. 75-114. New York: Wiley.
67. Bockus B. J., C. D. Stiles. 1984. Regulation and cytoskeletal architecture by platelet-derived growth factor, insuline, and epidermal growth factor. *Exp. Cell Res.* 153:186-197.
68. Nistér M., A. Hammacher, K. Mellstrom, A. Siegbahn, L. Ronnstrand, B. Estermark, C-H. Heldin. 1988. A glioma-derived PDGF-A chain homodimer has different funcional activities from PDGF-AB heterodimer purified from human platelets. *Cell* 52: 791-799.

69. Kazlauskas A., D. Bowen-Pope, R. Seifert, C. E. Hart, J. A. Cooper. 1988. Different effect of homo- and heterodimers of platelet-derived growth factor A and B chains on human and mouse fibroblasts. *EMBO J.* 7: 3727-3735
70. Hosang M., M. Rouge, B. Wipf, B. Eggmann, F. Kaufmann, W. Hunziker. 1989. Both homodimeric isoform of PDGF (AA and BB) have mitogenic and chemotactic activity and stimulate phosphoinositol turnover. *J. Cell. Physiol.* 140: 295-304.
71. Matsui T., J. H. Pierce, T. P. Fleming, J. S. Grennberg, W. J. LaRochelle, M. Ruggiero, S. A. Aaronson. 1989. Independent expression of human α or β platelet-derived growth factor receptor cDNAs in a native hematopoietic cell leads to functional coupling with mitogenic and chemotactic signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 8314-8318.
72. Hoppe J., H. A. Weich, W. Eichner, D. Tatje. 1990. Preparation of biologically active platelet-derived growth factor isoform AA and AB. Preferential formation of AB heterodimer. *Eur. J. Biochem.* 187:207-214.
73. Eichner W., V. Jager, D. Herbst, H. Hauser, J. Hoppe. 1989. Large-scale preparation of recombinant platelet-derived growth factor AA secreted by recombinant baby hamster kidney cells. *Eur. J. Biochem.* 185: 135-140.
74. Simm A., V. Hoppe, D. Tatje, A. Schenzinger, J. Hoppe. 1992. PDGF-AA effectively stimulates early events but has no mitogenic activity in AKR-2B mouse fibroblast. *Exp. Cell Res.* 201: 192-199.
75. Hall D. J., C. D. Stiles. 1987. Platelet-derived growth factor-inducible genes respond differentially to at least two distinct intracellular second messengers. *J. Biol. Chem.* 262: 15302- 15308.
76. Lev S., D. Givol, Y. Yarden. 1991. A specific combination of substrates is involved in signal transduction by kit-encoded receptor. *EMBO J.* 10: 647-654.
77. Majesky M. W., E. P. Benditt, S. M. Schwartz. 1988. Expression and development control of platelet-derived growth factor A-chain and B-chain/c-sis genes in rat aortic smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:1524-1528.
78. Graves D. T., G. R. Grotendorst, H. N. Antoniades, C. S. Schwartz, A. J. Valente. 1989. Platelet-derived growth factor is not chemotactic for human peripheral blood monocytes. *Exp. Cell. Res.* 180: 497-503.
79. Greenberg M., A. L. Hermanowski, B. A. Ziff. 1986. Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1050-1057.

80. Hall D. J., J. A. Alberta, C. D. Stiles. 1989. Labile repressors are involved in the transcriptional control of PDGF-responsive genes. *Oncogene Res.* 4: 177-184.
81. Mitchell P. J., R. Tjian. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.
82. Leof B. E., J. A. Proper, A.S. Goustin, G. D. Shipley, P. E. DiColetto, H. L. Moses. 1986. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor β : A proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:2453-2457.
83. Rao C. D., H. Igarashi, I-M. Chiu, K. C. Robbins, S. A. Aaronson. 1986. Structure and sequence of the human c-sis platelet-derived growth factor 2 (sis/PDFG-2) transcriptional unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2392-2396.
84. Rao C. D., M. Pech, K. C. Robbins, S. A. Aaronson. 1988. The 5' untranslated sequence of c-sis/platelet-derived growth factor 2 transcript is a potent translational inhibitor. *Mol. Cell. Biol.* 8: 284-292.
85. Kaetzel D. M., D. W. Coyne, R. A. Fenstermaker. 1993. Transcriptional control of the platelet-derived growth factor subunit genes. *BioFactors* 4: 71-81.
86. Chiu I-M., E. P. Reddy, D. Givol, K. C. Robbins, S. R. Tronick, S. A. Aaronson. 1984. Nucleotide sequence analysis identifies the human c-sis proto-oncogene as a structural gene for platelet-derived growth factor. *Cell.* 37: 123-129.
87. Pech M., D. Rao, K. C. Robbins, S. A. Aaronson. 1989. Functional identification of regulatory elements within the promoter region of the platelet-derived growth factor 2. *Mol. Cell. Biol.* 9: 396-405.
88. Franklin G. C., M. Donovan, G. I. R. Adam, L. Holmgren, S. Pfeifer-Ohlsson, R. Ohlsson. 1991. Expression of the human PDGF-B gene is regulated by both positively and negatively cell-type-specific regulatory elements located in the first intron. *EMBO J.* 6: 1365-1375.
89. Dirks R., H. J. Jansen, J. Gerritsma, C. Onnekink, H. P. Bloemers. 1993. Localization and functional analysis of DNase-I-hypersensitive sites in the human c-sis/PDGF-B gene transcription unit and its flanking region. *Eur. J. Biochem.* 211: 509-519.
90. Van den Ouweland A. M. W., J. J. M. Van Groningen, J. A. Schalken, H. W. Van Neck, H. P. J. Bloemers. 1987. Genetic organization of the c-sis transcription unit. *Nucleic Acids Res.* 15: 959-970.

91. Ratner L., B. Thielman, T. Collins. 1987. Sequence of the 5' portion of the human c-sis gene: characterization of the transcriptional promoter and regulation or expression of the protein product by 5' untranslated mRNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 15 : 6017-6036.
92. Van den Ouweland A. M. W., A. J. M. Roebroek, J. A. Schalken, C. A. A. Claesen, H. P. J. Bloemers, W. J. M. Van de Ven. 1986. Structure and nucleotide sequence of the 5' region of the human and feline c-sis promoter proto-oncogenes. *Nucleic Acids Res.* 14: 765-778.
93. Press R. D., A. Misra, G. Gillaspay, D. Samols, D. A. Goldthwait. 1989. Control of the expression of c-sis mRNA in human glioblastoma cells by phorbol ester and transforming growth factor β . *Cancer Res.* 49: 2914-2920.
94. Muller H-P., W. Schaffner. 1990. Transcriptional enhancers can act *in trans*. *Trends Genet.* 6: 300-304.
95. Angel P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, M. Karin. 1987. Common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell.* 49: 729-739.
96. Lozzio C. B., B. B. Lozzio. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 45:321-334.
97. Colamonici O. R., J. B. Trepel, C. A. Vidal, L. M. Neckers. 1986. Phorbol ester induces c-sis gene transcription in stem cell line K562. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1847-1850.
98. Atilano R., L. C. Andersson, C. Betsholtz, K. Nilsson, B. Westermark, C-H. Heldin, K. Atilano. 1987. Induction of platelet-derived growth factor gene expression during megakaryoblastic and monocytic differentiation of human leukemia cell lines. *EMBO J.* 6: 1213-1218.
99. Jin H-M., M. L. Brady, W. E. Fahl. 1993. Identification and characterization of an essential activating regulatory element of the human SIS/PDGFB promoter in human megakaryocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7363-7567.
100. Takimoto Y., Z-Y. Wang, K. Robler, T. F. Deuel. 1991. Promoter region of the human platelet-derived growth factor A-chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 1686-1690.
101. Shaw G., R. Kamen. 1986. A Conserved AU sequence from 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell.* 46: 659-667.

102. Daniel T. O., Z. Fen. 1988. Disting pathway mediate transcriptional regulation of platelet-derived growth factor B/c-sis expression. J. Biol. Chem. 263: 19815-19820.
103. Press R. D., D. Samols, D. A. Goldthwait. 1988. Expression and stability of c-sis mRNA in human glioblastoma cells. Biochem. 27: 5736-5741.
104. Fen Z., T. O. Daniel. 1991. 5' Untranslated sequences determine degradative pathway for alternate PDGF/c-sis mRNA's. Oncogene 6: 953-959.
105. Seifert R. A., S. M. Schwartz, D. F. Bowen-Pope. 1984. Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. Nature. Lond. 311: 669-671.
106. DiColetto P.E., D. F. Bowen-Pope. 1983. Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 1919-1923.
107. Gostin A. S., C. Betsholtz, S. Pfeifer-Ohlsson, H. Persson, J. Rydnert, M. Bywater, G. Holmgren, C-H. Heldin, B. Westermark, R. Ohlsson. 1985. Co-expression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of human trophoblast growth. Cell 41: 301-312.
108. Mornex J.F., Y. Martinet, K. Yamauchi, P.B. Bitterman, G. R. Grotendorst, A. Chytil-Weir, G. R. Martin, R. G. Crystal. 1986. Spontaneous expression of the c-sis gene and release of a Platelet-derived growth factor like molecule by human alveolar macrophage. J. Clinic. Invest. 78:61-66.
109. Martinet Y., P. B. Bitterman, J. F. Mornex, G. R. Grotendorst, G. R. Martin, R. G. Crystal. 1986. Activated human monocytes express the c-sis proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. Nature 319: 158-160
110. Antoniadis H. N., T. Galanopoulos, J. Neville-Golden, C. P. Kiritsy, S. Lynch. 1991. Injury induce *in vivo* expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 565-569.
111. Heldin C. H., B. Westermark, A. Wasteson. 1980. Chemical and biological properties of a growth factor from human cultured osteosarcoma cells: Resemblance with platelet-derived growth factor. J. Cell. Physiol. 105: 235-246.
112. Eva A., K. C. Robbins, P. R. Anderson, A. Srinivasan. 1982. Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumor cells. Nature 295:116-119.

113. Norris J. S., L. E. Cornett, J. W. Hardin, P. O. Kohler, S. L. MacLeod, A. Srivastova, A. J. Syms, R. G. Smith. 1984. Autocrine regulation of growth: II Glucocorticoids inhibit transcription of c-sis oncogene-specific RNA transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:124-128.
114. Helden C-H., C. Betsholtz, A. J. Johnson, M. Nistér, B. Ronnstrand, A. Wasteson, B. Westermark. 1985. Platelet-derived growth factor: Mechanism of action and relation to oncogenes. *J. Cell. Sci. Suppl.* 3: 65-76.
115. Clark J. G. 1987. The molecular pathology of pulmonary fibrosis. In: J. Uitto, A. Peredja eds, *Diseases of the Connective Tissue: The molecular Pathology of the Extracellular Matrix*. New York, Dekker, pp 321-343.
116. Crouch E. 1990. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.* 259: L159-L1814.
117. Antoniadis H. N., M. A. Bravo, R. E. Avila, T. Galanopoulos, J. Neville-Golden, M. Maxwell, M. Selman. 1990. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 86: 1055-1064.
118. Martinet Y., W. N. Rom, G. R. Grotendorst, G. R. Martin, R. G. Crystal. 1987. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophage from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Eng. J. Med.* 317: 202-209.
119. Maniatis T. E., E. F. Frisch, J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
120. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
121. Birboim H. C., J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
122. Josephs F. S., L. Ratner, M. F. Clark, E. H. Westin, M. S. Reitz, F. Wong-Staall. 1984. Transforming potencial of human c-sis nucleotide sequences encoding platelet-derived growth factor. *Science.* 225:636-639.
123. Tso J. T., X. Sun, T. Kao, S. K. Reece, R. Wu. 1985. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 13: 2485-2502.

124. Johnson P. H., L. I. Grossman. 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separation of conformational isomers of double and single-stranded DNAs. *Biochem.* 16:4217-4220.
125. Dretzen G., M. Bellard, P. Sassone-Corsi, P. Chambon. 1980. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 112: 295-298.
126. Feinberg A. P., B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
127. Chomczynski P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
128. Thomas P. S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201-5205.
129. Khandjian E. W. 1987. Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes. *Bio/Tech.* 5:165.
130. Antoniadis H. N., P. Pantazis. 1987. Structural and functional identification of platelet-derived growth factor by mammalian cells. *Methods in Enzymol.* 147: 22-40
131. Bauman D. M., M. A. Jetten, C. J. Bonner, K. R. Kumar, A. R. Bennett, R. A. Brody. 1990. Secretion of a platelet-derived growth factor homologue by rat alveolar macrophages exposed to particulates *in vitro*. *E. J. Cell Biol.* 51:327-334.
132. Paulsson Y., A. Hammacher, C-H. Heldin, B. Westermark. 1987. Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblast. *Nature* 328:715-717.
133. Paulsson Y., R. Austgulen, E. Hofstly, C-H. Heldin, B. Westermark, J. Nissen-Meyer. 1989. Tumor necrosis factor induced expression of platelet-derived growth factor A-chain messenger RNA in fibroblast. *Exp. Cell Res.* 180: 490-496.
134. Bategay E., J. E. Raines, R. A. Seifert, D. F. Bowen-Pope, R. Ross. 1990. TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell.* 63: 515-524.
135. Raines E. W., S. K. Dower, R. Ross. 1989. Interlukin-1 mitogenic activity for fibroblast and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science.* 243: 393-396.
136. Soma Y., G. R. Grotendorst. 1989. TGF- β stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. *J. Cell Physiol.* 14: 246-253.

137. Stroobant P., M. D. Waterfield. 1984. Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 3: 2963-2967.
138. Collins T., D. Ginsburg, J. M. Boss, S. H. Orkin, J. S. Pober. 1985. Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B-chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature.* 316: 748-750.
139. Westermark B., C-H. Heldin. 1991. Platelet-derived growth factor in autocrine transformation. *Cancer Res.* 51:5087-5092.
140. Katayose D., M. Ohe, K. Yamauchi, M. Ogata, K. Shirato, H. Fujita, S. Shibahara, T. Takishima. 1993. Increased expression of PDGF A- and B-chain genes in rat lungs with hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 264:L100-L106.
141. Ignatz R., J. Massague. 1986. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 261:4337-4342.
142. Fine A., R. H. Goldstein. 1987. The effect of transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblast. *J. Biol. Chem.* 262:3897-3902.