



00381
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MODULACION DE LA RESPUESTA FIBROBLASTICA
INDUCIDA POR FACTORES DE CRECIMIENTO

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

NORMA ALICIA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALVARO OSORNIO VARGAS

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta Tesis está dedicada a:
ARMANDO MARIN B. pareja,
amigo, compañero, ...

Sin quien la realización de la
misma no hubiera sido posible

Gracias...
Por todo tu amor, comprensión,
apoyo, confianza, paciencia, ...

Acknowledgment

I would like to thank Dr. Geoffrey J. Laurent, Dr. Robin McNulty and all my friends from The Biochemistry Unit, whose love support and encouragement have allowed me to pursue my academic career.

Part of this thesis was developed in The National Heart and Lung Institute, at The Biochemistry Unit, Centre for Respiratory Research and Division of Cardiopulmonary Biochemistry, University College London, Medical School UK under supervision of Dr. Geoffrey J. Laurent

Otra parte se realizó en el Instituto Nacional de Cancerología, en las Divisiones de Investigación Básica y Clínica, México, D.F. Supervisión del Dr. Alvaro Osorio.

La realización de este trabajo fue financiada por:

Consejo Británico

El Programa Universitario de Investigación en Salud (UNAM)

Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM

Instituto Nacional de Cancerología (Proyecto CONACYT F383-M9304)

El PDGF y el anti-PDGF empleados para la realización de los experimentos del capítulo 5 de la presente tesis, fueron donados por los laboratorios: Pulmonary Pathobiology y Airway Inflammation N.C. USA.

INDICE

INDICE GENERAL	2
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	7
ABREVIATURAS EMPLEADAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCION	12
CAPITULO 1	
ANTECEDENTES	16
I. Actividad biológica de Fibroblastos	17
Quimiotáxis	17
Proliferación	18
i) Ciclo celular	18
ii) Factores de crecimiento, reguladores del ciclo celular	19
Proliferación de fibroblastos y fibrosis pulmonar	21
II. Mediadores de Actividad Fibroblástica	24
Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)	25
i) Estructura	26
ii) Genes del PDGF	26
iii) Receptores para PDGF	26
iv) Efecto Biológico del PDGF	27
v) PDGF mediador de cicatrización y fibrosis	27
Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β)	28
α -Trombina	31
i) Moduladora de la respuesta fibroblástica	32
ii) Inductora de proliferación fibroblástica	32
iii) Quimiotáxis inducida por la α -trombina en fibroblastos	34
Otros Factores de Crecimiento	34
Interacción entre citocinas	38
III. Colágenas	38
Distribución de colágenas en el pulmón	39
Metabolismo de colágenas	39
i) Síntesis	40
ii) Degradación	40
- Intracelular	41
- Extracelular	41
Regulación del metabolismo de colágena	42
Colágena y fibrosis	43
IV. Fibrosis pulmonar	44
Definición	44
Fibrosis pulmonar intersticial	44
i) Fibrosis Inducida por la inhalación de partículas	44
ii) Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)	45

iii) Fibrosis pulmonar asociada a Esclerosis Sistémica (ES)	46
iv) Fibrosis pulmonar asociada a sarcoidosis	47
Patogénesis	48
CAPITULO 2	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
CAPITULO 3	
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA INDUCIDA EN FIBROBLASTOS DE PULMÓN HUMANO POR LA α-TROMBINA	58
I. Materiales y métodos	59
Pacientes	59
Lavado broncoalveolar (LBA)	59
Cuenta celular	60
Procesamiento de los LBA	60
i) Concentración de los LBA por ultrafiltración	60
ii) Determinación de proteínas totales en LBA	60
iii) Determinación de albúmina en LBA	61
iv) Cuantificación de trombina en LBA	61
Cultivo celular	61
Ensayo de proliferación celular	62
i) Validación del ensayo de proliferación celular	63
Identificación de otros factores de crecimiento en LBA	63
Metabolismo de colágena	64
i) Estimación de la producción de procolágena	64
ii) Obtención de aminoácidos conjugados al cromógeno	65
iii) Instrumentación y condiciones cromatográficas (HPLC)	65
iv) Índices de síntesis y degradación de procolágena	66
v) Estimación del contenido de DNA en cultivo	67
vi) Ensayo de DNA	67
Separación de proteínas presentes en LBA (SDS-PAGE)	68
i) Preparación de muestras SDS-PAGE	69
ii) Tinción de plata	69
Inmunolectro-transferencia	69
i) Inmunodetección de trombina en LBA	70
ii) Detección de trombina por quimioluminiscencia (ECL)	70
Análisis de Northern blot para procolágena inducida por trombina	71
Análisis estadístico de los resultados	71
II. Resultados	72
Determinación de trombina en muestras de LBA	72
i) Curva estándar de trombina	72
ii) Niveles de trombina en muestras de LBA	72
Proliferación celular	72

Determinación de condiciones óptimas de cultivo	72
<i>i)</i> Curva dosis respuesta a NCS en fibroblastos IMR-90	72
<i>ii)</i> Curva dosis respuesta a trombina en el tiempo	73
Determinación de la dilución óptima de LBA	74
<i>i)</i> Efecto de LBA de pacientes con fibrosis en proliferación	75
<i>ii)</i> Correlación entre trombina de LBA (ES) y proliferación	76
Determinación de la contribución específica de la trombina a la proliferación	77
<i>i)</i> Efecto inducido por hirudín, PPACK y AT III en proliferación	77
<i>ii)</i> Inhibición de la proliferación inducida por LBA (ES, FPI y sarcoidosis) por hirudín y PPACK	79
Identificación de otros factores de crecimiento presentes en LBA	80
<i>i)</i> Proliferación inducida por LBA (ES, FPI y sarcoidosis) con anticuerpos anti-PDGF, anti-TGF β , anti-IGF-1	81
Mecanismo de proliferación inducido por la trombina	82
<i>i)</i> Proliferación inducida por trombina en presencia de anti-PDGF y anti-TGF β	83
<i>ii)</i> Curva dosis respuesta a trombina en diferentes tiempos	84
<i>iii)</i> Proliferación inducida por trombina (8 hrs) previa inhibición con hirudín y PPACK	84
Efecto inducido por trombina en fibroblastos de un paciente (FPI)	85
<i>i)</i> Proliferación inducida por trombina y su inhibición por hirudín y PPACK	85
<i>ii)</i> Proliferación inducida por el LBA de pacientes con FPI y ES	85
<i>iii)</i> Proliferación inducida por LBA de pacientes con ES	86
Modulo del metabolismo de colágena inducido por trombina	88
<i>i)</i> Efecto inducido por la trombina en la síntesis y degradación de colágena	86
<i>ii)</i> Inhibición del efecto inducido por la trombina en el metabolismo de colágena	88
Identificación de proteínas en muestras de LBA	88
<i>i)</i> Curva estándar de proteínas y albúmina	88
<i>ii)</i> Determinación de proteínas en muestras de LBA	88
Identificación del peso molecular de proteínas del LBA (SDS-PAGE)	90
Inmunolectro-transferencia para identificación de trombina en LBA	90
<i>i)</i> Concentración óptima del anticuerpo anti-trombina	90
<i>ii)</i> Inmunolectro-transferencia del estándar de trombina (SDS-PAGE 12.5%)	91
<i>iii)</i> Inmunolectro-transferencia para trombina presente en LBA (ES)	91
Expresión génica de la procolágena α 1(I) inducida por trombina	93
Resumen de resultados	93

**CAPITULO 4
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA INDUCIDA EN FIBROBLASTOS DE
PULMÓN HUMANO POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTEβ** 95

I. Materiales y métodos	96
Cultivo celular	96
Ensayo de proliferación celular	98
Metabolismo de colágena	97
Quimiotáxis	97
Análisis estadístico de los resultados	98
II. Resultados	99
Proliferación celular	99
Efecto de TGFβ ₁₋₃ en la proliferación de fibroblastos normales	99
Efecto de TGFβ ₁₋₃ en la proliferación de fibroblastos de pacientes (FPI y ES)	100
Mecanismo de inhibición en la proliferación fibroblástica inducido por TGFβ	102
Efecto de TGFβ ₁₋₃ en la proliferación de fibroblastos en presencia o ausencia de indometacina (24h, 48h y 72 h).	103
i) (TGFβ ₁₋₃ 160 pg/ml)	103
ii) (TGFβ ₁₋₃ 80 pg/ml)	104
iii) (TGFβ ₁₋₃ 5 pg/ml)	104
Efecto del anti-TGFβ en la inhibición de la proliferación inducida por TGFβ	105
Efecto inducido por TGFβ ₁₋₃ en el metabolismo de la colágena	107
Quimiotáxis inducida por TGFβ ₁₋₃	107
i) En fibroblastos normales	108
ii) En fibroblastos de pacientes con ES y FPI	108
Resumen de resultados	108

**CAPITULO 5
EXPRESION Y SECRECION DE PDGF EN MA ESTIMULADOS POR PARTICULAS
INORGANICAS Y LA RESPUESTA QUIMIOTACTICA DIFERENCIAL DE FIBROBLASTOS
A LOS DIMEROS DEL PDGF** 110

I. Materiales y métodos	111
Cultivo celular	111
Obtención de macrófagos alveolares (MA)	111
Activación de macrófagos por hierro carbonilo	112
Inmunoensayo enzimático para identificación de PDGF	113
Análisis de Northern y dot blot	114
Quimiotáxis	115
Análisis estadístico de los resultados	116
II. Resultados	116
Actividad biológica del PDGF	116
i) Inducción de la expresión y secreción del PDGF en MA por partículas	118

Viabilidad celular	115
Secreción de PDGF a diferentes tiempos	117
ii) Expresión génica de PDGF en el tiempo	117
Análisis de Dot blot	118
Análisis de Northern blot	119
iii) Quimiotaxis inducida por PDGF en fibroblastos	121
Resumen de resultados	122
CAPITULO 6	123
DISCUSION	124
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

ANEXO

Publicaciones obtenidas con resultados de la presente tesis

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Ciclo celular	18
Figura 2. Cascada de la coagulación	31
Figura 3. Reacción del NBD-Cl con la hidroxiprolina	65
Figura 4. Cromatograma de la hidroxiprolina (HPLC)	66
Cuadro 1. Efecto de factores de crecimiento en fibroblastos	24
Cuadro 2. Proteínas totales en muestras de LBA	88
Cuadro 3. Albúmina en muestras de LBA	89

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ES	Esclerosis sistémica
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
LBA	Lavado broncoalveolar
PPACK	D-Phe-Pro-Arg-CH ₂ Cl (inhibidor de trombina)
NCS	Suero de ternera recién nacido
HYP	Hidroxiprolina
NBD-Cl	Cloruro de nitrobenzoxadiazol
MA	Macrófago alveolar
AT III	Antitrombina III
PM	Peso molecular
α TGF β	Anticuerpo anti-TGF β
α PDGF	Anticuerpo anti-PDGF
α IGF-1	Anticuerpo anti-IGF-1
HPLC	Cromatografía Líquida de alta precisión
PGE ₂	Prostaglandina E2

RESUMEN

La respuesta biológica de los fibroblastos puede ser modulada por diversos factores de crecimiento. Alteraciones en las funciones fibroblásticas, como un aumento en su proliferación y en la síntesis de colágena, así como una alta concentración pulmonar de algunas citocinas, se han reportado en padecimientos fibróticos pulmonares. Las teorías más recientes en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, postulan que mediadores polipeptídicos producidos por células presentes en el pulmón, activan a los fibroblastos pulmonares, y éstos se reproducen y producen mayores cantidades de colágena. El principal objetivo del presente trabajo, fué determinar la posible modulación fibroblástica, inducida por 3 factores de crecimiento diferentes: la α -Trombina, el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β) y tres de sus diferentes formas estructurales, y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). Se empleó un ensayo basado en el uso de un sustrato cromogénico de la trombina (S-2238), para cuantificar su presencia en lavados broncoalveolares (LBA) de pacientes con esclerosis sistémica (ES), fibrosis pulmonar idiopática (FPI), sarcoidosis y en voluntarios sanos. Mediante el empleo de un ensayo colonimétrico basado en el uso de azul de metileno, se evaluó la capacidad de los diferentes factores en estudio, para inducir un incremento en la proliferación. Mediante cromatografía HPLC fase reversa, se evaluó su efecto en el metabolismo de la colágena de fibroblastos normales, y usando microcámaras modificadas de Boyden se ensayó su capacidad para atraer a fibroblastos de pulmón humano normal o de pacientes fibróticos. Los resultados obtenidos demostraron que la trombina está presente en altas concentraciones sólo en LBA de pacientes con ES. Aunque todas las muestras de LBA de pacientes con fibrosis indujeron un incremento en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano, sólo la proliferación inducida por los LBA de pacientes con ES fué inhibida hasta en un 60% por 2 inhibidores específicos de la trombina. La trombina pura fué capaz de inducir un incremento del 200% en la síntesis y producción de procolágena y un aumento en la expresión del gene de procolágena $\alpha(1)$ I. Para TGF $\beta_{1,2}$ se demostró que a dosis bajas se inducía una estimulación de la proliferación, efecto contrario al observado a dosis altas. En cuanto al metabolismo de colágena los 3 TGF β s, en forma semejante, incrementaron la producción de colágena y una disminución en su degradación. Ninguno de éstos indujo quimiotáxis en fibroblastos normales o de pacientes con fibrosis pulmonar. Finalmente se investigó la modulación de la expresión y secreción de PDGF por macrófagos alveolares de rata expuestos a partículas de hierro carbonilo y el efecto inducido por los dímeros del PDGF (AA, AB y BB) en la quimiotáxis de fibroblastos pulmonares. El gene que codifica para la cadena B del PDGF, se expresó inmediatamente después de la exposición de los macrófagos a partículas, mientras que el

gene que codifica para la cadena A del PDGF, se expresó hasta una hora después, alcanzando un máximo después de 4 horas. La secreción del PDGF se incremento después de 2 horas de exposición a partículas. En cuanto a los resultados de quimiotaxis, el PDGF AA no indujo mayor estimulación quimiotáctica mientras que AB y BB indujeron un efecto considerable. Estos resultados demuestran que los diversos factores en estudio, modulan la respuesta fibroblástica de diferente forma y que esta modulación podría tener repercusiones importantes en padecimientos fibróticos. Además los resultados sugieren que la modulación inducida por cada factor de crecimiento es aparentemente selectiva, hecho que contribuye al mejor entendimiento de los mecanismos de patogénesis de la fibrosis pulmonar.

ABSTRACT

Fibroblast activity is up-regulated by growth factors. Abnormalities in the proliferative and synthetic characteristics of the fibroblast may lead to pulmonary fibrosis, a disorder characterized by an alteration on collagen deposition as well as high levels of growth factors levels within the lung parenchyma. The current theory for the pathogenesis of pulmonary fibrosis is based on the hypothesis that polypeptide mediators produced by cells present in the lung, activate fibroblast to either proliferate or produce more collagen. The aim of this thesis was to determine the possible growth factor-induced up-regulation of human pulmonary fibroblasts activities by α -thrombin, three isoforms of the Transforming Growth Factor β (TGF β _{1, 2, 3}), and the Platelet-Derived Growth Factor (PDGF). Using a chromogenic assay, measurements of thrombin levels in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from patients with systemic sclerosis (SSc), cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA), sarcoidosis and normal controls were made. Its contribution to BALF-induced fibroblast proliferation was also assessed. Proliferation of human lung fibroblast in response to growth factors was assessed using a spectrophotometric assay based on the uptake and subsequent elution of the dye methylene blue. In parallel, measurements on thrombin ability to induce changes in fibroblast collagen metabolism were assessed by an HPLC technique using hydroxiprolinone as an index of procollagen synthesis. The median thrombin concentration in BALF from SSc patients was four-fold higher than levels measured in controls. BALF from all patients stimulated fibroblast proliferation compared with controls, however the use of two thrombin inhibitors, only attenuated the proliferation induced by BALF from patients with SSc. Also has been shown that thrombin increase gene expression of procollagen α (1) I, and the synthesis and production of procollagen. In relation to the effects induced by TGF β isoforms_{1,2,3} on proliferation, chemotaxis and collagen metabolism on normal human pulmonary fibroblast and fibroblast from patients with pulmonary fibrosis, low doses of each TGF β isoform induced an stimulation on fibroblast proliferation which changed to inhibition at higher doses. All TGF β isoforms induced an increase on collagen production and decreases its degradation. None of the tested TGF β isoforms induced chemotaxis on normal fibroblasts or from patients with pulmonary fibrosis. Chemotaxis induced by PDGF dimers (-AA, -AB, and -BB) on pulmonary fibroblast was assessed. In parallel expression and secretion of PDGF on alveolar macrophages (AM) that were stimulated *in vitro* with iron particles were assessed. Differential induced chemotaxis were observed depending on the PDGF dimer used. PDGF-AA did not stimulate fibroblast chemotaxis, meanwhile PDGF-BB and -AB induced an increase in fibroblast chemotaxis. Iron particles stimulated PDGF gene expression on AM. The PDGF B chain was expressed immediately after particle exposure, while PDGF A chain

expression was turned on until one hour later, with a maximal expression after four hours. PDGF secretion was maximum 2 hours after iron-particle exposition. All together these data support the hypothesis that different growth factors up-regulate fibroblast activity in different ways, and that these up-regulations could be relevant for pulmonary fibrosis. Also these data suggest a selective modulation induced by each growth factor. These facts could be important on the understanding of the pathogenesis of pulmonary fibrosis.

INTRODUCCION

Los fibroblastos son células derivadas del mesodermo embrional, que se encuentran ampliamente distribuidas en el tejido conjuntivo fibroso. Se sabe que participan en procesos normales de reparación como la cicatrización y que probablemente, estén involucrados en el establecimiento de algunos procesos patológicos como la fibrosis pulmonar (Avery, 1966). La importancia de los fibroblastos en el establecimiento de un proceso fibrótico pulmonar, se ha atribuido a que una de sus funciones principales, es la producción de algunos componentes de la matriz extracelular. Dichos componentes como la colágena, la laminina y la fibronectina, son fundamentales en este tipo de padecimientos, ya que se acumulan en grandes cantidades en el parénquima pulmonar (Wilkie, 1995, McAnulty, 1995).

Numerosos mediadores del tipo polipeptídico, denominados factores de crecimiento o citocinas que influyen la función fibroblástica han sido descritos (Argelli, 1986, Goldstein 1986, Crouch, 1990), cabe mencionar que en el caso de diversas lesiones pulmonares, el estudio de dichos factores, se ha documentado ampliamente (Kelley, 1990, Kovacs, 1994). Específicamente se sabe que algunos de éstos estimulan a los fibroblastos a sintetizar mayores cantidades de colágena, como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) (Varga, 1986, McAnulty 1991, Overall, 1989), mientras que otros estimulan su proliferación y quimiotáxis a sitios específicos, como el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) (Seppa, 1982, Osomio, 1990, Bonner, 1990), la trombina (Gray, 1990, Dawes, 1993, Bar-Shavit, 1992), la endotelina-1 (ET-1) (Cambrey, 1992, Peacock, 1992) y el Factor de Crecimiento Semejante a Insulina (IGF-1) (Goldstein, 1989, Philips, 1987, Cambrey, 1994), etc.

De lo anterior se deduce que la respuesta de los fibroblastos, puede ser modulada por diversos factores de crecimiento, al menos en tres niveles diferentes a saber: el metabolismo de la colágena, la regulación de su proliferación y su quimioatracción a un sitio de lesión específico. Debido a que los fibroblastos constituyen cerca del 40% de la población celular del pulmón, y a que en pulmones de pacientes fibróticos, se han reportado altas concentraciones de algunas citocinas, y alteraciones en las funciones celulares antes mencionadas (Richards, 1991, McAnulty, 1995); el fibroblasto y su modulación inducida por citocinas, cobran particular importancia en el establecimiento de los mecanismos tempranos de la patogénesis en la fibrosis pulmonar.

La fibrosis pulmonar es el estadio final de una serie de desórdenes heterogéneos, que en apariencia tienen en común la acumulación de colágena (McAnulty, 1995). El depósito excesivo de esta proteína de matriz extracelular, se ha atribuido al desequilibrio entre su síntesis y su degradación (Laurent, 1986, McAnulty, 1995). Una de las hipótesis que intentan explicar el desarrollo de la fibrosis pulmonar, postula que factores de crecimiento son secretados por células pulmonares (fibroblastos, células epiteliales y endoteliales), o por células de la circulación presentes en el pulmón (macrófagos, neutrófilos, linfocitos), y que son éstos quienes atraen a los fibroblastos al sitio de lesión pulmonar y estimulan su duplicación y la síntesis de excesivas cantidades de colágena (Harrison, 1991, Roberts, 1993 McAnulty, 1995).

Durante el desarrollo de un fenómeno fibrogénico, más de un factor de crecimiento está involucrado, por lo tanto la secuencia de eventos que suceden en estas fases tempranas de la fibrogénesis podrían estar reguladas por el o los tipos de factores de crecimiento secretados, la secuencia de su aparición, la interacción entre ellos, su concentración en el microambiente celular, las características y concentración de sus receptores en la superficie celular, el tipo de agente que inicie la lesión, etc. (Kelley, 1990, Crouch, 1990).

Considerando la complejidad de un sistema *in vivo* y el gran número de variables que se tendrían que manipular *in vitro* para determinar el papel de cada uno de los factores antes mencionados en el establecimiento de un fenómeno fibrótico pulmonar, el presente trabajo se limitó al estudio de tres factores de crecimiento: la α -trombina, el TGF- β (se consideraron tres de sus diferentes formas estructurales TGF β 1,2,3), y el PDGF. Todos ellos conocidos como moduladores de la respuesta fibrilástica y por tanto posiblemente implicados en el desarrollo de un padecimiento fibrótico pulmonar.

En el presente trabajo y con el fin de ampliar nuestro conocimiento acerca de la modulación fibrilástica potencialmente inducida por los factores de crecimiento antes mencionados, y establecer sus posibles consecuencias en fenómenos fibróticos, se determinó su efecto a nivel de la proliferación celular, la quimiotáxis y el metabolismo de la colágena de fibroblastos de pulmón humano. Cabe destacar que estos procesos se han reportado como esenciales en el establecimiento de una fibrosis pulmonar (McAnulty, 1991, McAnulty, 1995).

A fin de facilitar la interpretación del presente trabajo, se incluyó una sección de antecedentes, en la que en forma general se revisan conceptos básicos, esenciales para el

entendimiento de los resultados obtenidos en el mismo, y que permitirán una mejor evaluación del alcance de éstos. La presentación de los materiales, métodos y resultados se subdivide en capítulos diferentes, en cada uno de los cuales se incluyó el estudio de un factor de crecimiento diferente.

El primero de estos, se enfoca al estudio del efecto biológico inducido *in vitro* por la α -trombina en fibroblastos de pulmón humano, a diferentes niveles: proliferación celular y metabolismo de colágena. Así mismo, se incluye la determinación del efecto inducido por la trombina, presente en los lavados broncoalveolares de pacientes con diferentes tipos de fibrosis pulmonar (asociada a esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar idiopática y sarcoidosis), en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano normal y fibrótico.

En el segundo capítulo, se muestra la determinación del efecto biológico inducido *in vitro*, por tres de las diferentes formas estructurales del Factor de Crecimiento Transformante β ($TGF\beta_{1-3}$), en fibroblastos de pulmón humano normal, a nivel de proliferación celular, quimiotaxis y metabolismo de colágena. También se incluye una comparación entre el efecto inducido por los $TGF\beta$ s en fibroblastos de pulmón normal y de pacientes con fibrosis pulmonar (idiopática y asociada a esclerosis sistémica).

El tercer capítulo, se destinó a dilucidar el efecto inducido por PDGF, a nivel génico, se empleó la exposición de MA a partículas inorgánicas y se evaluó el patrón de expresión génica de cada una de las cadenas polipeptídicas del PDGF (A y B) a través del tiempo (0-20 hrs). En paralelo se intentó establecer una correlación entre dicha expresión y la secreción de la proteína al medio y la determinación del efecto de cada una de las formas estructurales del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), como quimioatrayentes de fibroblastos pulmonares.

En el presente trabajo entonces, se consideraron una diversidad de factores de crecimiento implicados en diferentes sistemas biológicos como son los presentes en los lavados broncoalveolares de pacientes con distintos tipos de fibrosis pulmonar, el efecto de éstos en distintos tipos de fibroblastos (normales y de pacientes fibróticos) y la secreción de dichos factores por distintos tipos celulares, como pueden ser los fibroblastos o los macrófagos alveolares, en respuesta a estímulos externos desconocidos o conocidos.

La conjunción de estos resultados y la comparación del comportamiento inducido por los diferentes factores de crecimiento en los sistemas estudiados, permitió un mejor entendimiento de la modulación de la respuesta biológica inducida en fibroblastos por dichos factores de crecimiento. Adicionalmente, el análisis de los resultados, permitió desarrollar nuevas hipótesis acerca de los eventos esenciales en fenómenos específicos en los que esta modulación fibroblástica pudiera ser relevante, tal es el caso de algunos tipos de fibrosis pulmonar.

Cabe destacar que debido a que se trabajó con diferentes sistemas que semejan diferentes tipos de fibrosis, una en la que se conoce el agente causal (inducida por la inhalación de partículas inorgánicas) y otras en los que el agente etiológico es desconocido (Fibrosis pulmonar idiopática, asociada a esclerosis sistémica, y sarcoidosis), se pudieron establecer correlaciones interesantes entre los mecanismos celulares tempranos observados *in vitro* y que posiblemente pudieran ser comunes a todos estos padecimientos *in vivo*. Debido a la semejanza en las respuestas observadas a nivel de la modulación de la actividad fibroblástica, esto podría ser válido al menos en fases tempranas del desarrollo de este tipo de padecimientos.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

I. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FIBROBLASTOS

Los fibroblastos son células de origen mesenquimatoso, que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos son generalmente ahusados, es decir con forma alargada, y poseen un núcleo elíptico con uno o más núcleos (Avery, 1966). Su citoplasma se caracteriza por la presencia de un abundante retículo endoplásmico, numerosas mitocondrias y cuando están estimulados presentan una apariencia granular y basófila (Wilkie, 1995).

Las proteínas sintetizadas por los fibroblastos desempeñan un papel muy importante en los procesos de reparación. Además se sabe que estas células expresan en su superficie celular receptores denominados integrinas, que reconocen secuencias de aminoácidos que contengan arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), y que están presentes en la mayoría de las proteínas de la matriz extracelular (Wilkie, 1995). Esto permite suponer que existen interacciones entre las proteínas de la matriz y los fibroblastos, lo que facilita la contracción de la cicatriz y probablemente represente uno de los mecanismos de acción más importantes en la cicatrización normal y a su vez puede que sea relevante en procesos patológicos como la fibrosis.

QUIMIOTAXIS

Los fibroblastos son células capaces de migrar *in vivo* e *in vitro* bajo la influencia de factores quimiotácticos (Chang, 1981, Faller, 1994). Un gran número de agentes quimiotácticos para fibroblastos han sido caracterizados, algunos de estos son: el Factor Quimiotáctico para Fibroblastos Derivado de Linfocitos (LDFCF) (Postlethwaite, 1976), los tripéptidos y dipéptidos de las colágenas tipo I, II y III, (Postlethwaite, 1978), y los fragmentos de la fracción 5 del complemento (Postlethwaite, 1984).

En pacientes con fibrosis pulmonar diversos mediadores han sido implicados en el reclutamiento de fibroblastos al pulmón, entre otros la endotelina-1 (Giaid, 1993), el PDGF (Martinet, 1987, Osomio-Vargas, 1990), y la fibronectina (Kinsella, 1989, Seppa, 1982). Una vez que los fibroblastos son atraídos al sitio de lesión, éstos pueden ser secuestrados en este lugar por el mediador derivado de células T que se libera en el sitio de lesión y que selectivamente inhibe la migración de los fibroblastos a cualquier otra localización celular (Rola-Pleszczynski, 1982).

PROLIFERACION

La proliferación celular desempeña un papel muy importante en el desarrollo de : normal, la reparación de tejido dañado y el desarrollo de diferentes padecimientos como la pneumonitis, la bronquitis crónica, la fibrosis y el cáncer. La proliferación celular en regiones alveolares está muy bien documentada, especialmente en procesos en los que existe lesión tisular (Hakomar, 1975).

1) CICLO CELULAR

La proliferación de fibroblastos involucra una serie de eventos génicos y bioquímicos que poseen una secuencia ordenada y específica (Koshland, 1994). Aunque este proceso es continuo, para su estudio, puede ser dividido en cuatro fases (figura 1).

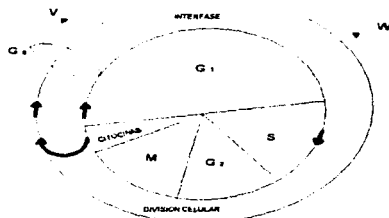


Figura 1. Representación esquemática del ciclo celular

La fase G₁ (Gap₁) es un período que precede a la síntesis de DNA, en esta fase se elevan la síntesis de proteína nuclear y citoplasmática. La fase S es un período de síntesis de DNA, mientras que la fase G₂ es un segundo período en el que se incrementa la síntesis de proteína nuevamente y se expande el citoplasma, la fase M o mitótica es el período de división celular. A las fases G₁, G₂ y S en conjunto se les denomina interfase, ya que la célula no está en división activa. M es la fase más corta del ciclo celular, generalmente no dura más de 60 minutos, período después del cual la célula puede entrar nuevamente al ciclo o bien iniciar su participación en diversas funciones tisulares. Las células altamente diferenciadas pierden su capacidad de división.

La fase S es similar en diferentes tipos celulares, usualmente dura entre 6 y 8 horas. Las mayores diferencias entre los ciclos celulares de células distintas, se encuentran en las fases G₁ y G₂ del ciclo (O'Connel, 1994). Específicamente para los fibroblastos, estas fases tienen una duración aproximada de 8 a 10 horas, sin embargo, varían considerablemente en otros tipos celulares. Una quinta fase del ciclo celular es la fase G₀, ésta es donde las células se encuentran en un periodo de descanso y no entran al ciclo celular.

Las células pueden salir de la fase G₀ e iniciar el ciclo celular en fase G₁ si reciben la señal bioquímica apropiada. Esta señal puede estar dada, por ejemplo, por factores de crecimiento. Por otro lado se sabe que existen sustancias diversas que inhiben la proliferación celular. Los más estudiados son los chajones, sustancias solubles que inhiben la proliferación por mecanismos de retroalimentación, es decir que cuando se encuentran en alta concentración actúan como inhibidores, mientras que a bajas concentraciones no tienen esta función (Murray, 1994). Aunque la presencia de tales chajones es controversial, la influencia de factores de crecimiento es ampliamente aceptada.

// FACTORES DE CRECIMIENTO, REGULADORES DEL CICLO CELULAR

Se sabe que diversos factores de crecimiento, inician una serie de eventos bioquímicos asociados con la duplicación de la masa celular y la síntesis de DNA. El mecanismo mediante el cual dichos factores de crecimiento inducen el reinicio del ciclo celular no está muy bien entendido, aunque se piensa que éstos actúan vía receptores de membrana específicos (Wrann, 1980, Heldin, 1984, Heldin, 1989, Wharton, 1982, Bowen-Pope, 1983, Collins, 1983), los cuales a su vez, inducen señales de transducción y fosforilación de diversas proteínas reguladoras de la función biológica (Cohen, 1980).

Los factores de crecimiento pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de actividad biológica que ejercen en el ciclo celular en: factores de crecimiento por competencia o por progresión (Stiles, 1979). Los primeros actúan en células que se encuentren en fase G₀ y las inducen a reiniciar la fase G₁ del ciclo celular, un ejemplo de éstos es el PDGF. Los factores de crecimiento de progresión, como el Factor de Crecimiento Semejante a Insulina (IGF-1), son necesarios para que las células continúen el ciclo celular a través de la fase G₁.

Aunque algunos factores de crecimiento pueden actuar como factores de competencia y de progresión, llevando a una célula desde su estado de reposo hasta la mitosis, en la mayoría de los casos se requiere de más de un factor de crecimiento para inducir la

proliferación celular máxima (Pledger, 1977). Por ejemplo el PDGF y el Factor de Crecimiento Epidémico (EGF) actúan principalmente al inicio de la fase G₁, regulando el número de células que entra al ciclo celular desde G₀ y sólo ejercen un efecto parcial en el período de transición entre la fase G₁ y S. El IGF-1 en cambio, actúa en el período de transición entre G₁ y S, sólo unas cuantas horas antes de que se inicie la síntesis de DNA.

El período de acción de los factores de crecimiento por competencia, tiene una duración aproximada de 18 horas. Aunque el mecanismo mediante el cual la inducción por competencia se lleva a cabo, es desconocido, se sabe involucra interacciones moleculares que resultan en cambios en la expresión génica. Al respecto, se sabe, que el PDGF induce la expresión de genes concomitantes mediadores de la proliferación (Baserga, 1985).

Además de la modulación del ciclo celular inducida por factores de crecimiento por competencia y por progresión, cabe destacar que se han identificado dos clases de genes relacionados con la regulación del ciclo celular. La primera clase incluye a aquellos genes cuya expresión es modulada a través del ciclo y son denominados ciclo celular dependientes, algunos ejemplos de éstos son los genes que codifican para las histonas, la timidín cinasa y la calmodulina (Denhardt, 1985). Los productos de este tipo de genes son requeridos por las células durante el ciclo celular, y aparentemente no están regulados por los factores de crecimiento.

La segunda clase de genes que es susceptible de regulación por factores de crecimiento, está constituida por genes de respuesta temprana, e incluye a proto-oncogenes celulares como el c-myc y el c-fos (Krujier, 1984, Muller, 1984). La transcripción de esta clase de genes se incrementa cuando las células en estado de reposo son estimuladas a entrar al ciclo celular y dividirse. Se sabe que los productos proteicos de los genes c-myc y c-fos, se unen al núcleo y actúan como reguladores de la transcripción (Curran y Franza, 1988), aunque también se ha demostrado que la expresión de c-fos puede ser necesaria pero no suficiente para iniciar el proceso de división celular. Algunos factores de crecimiento que se ha comprobado son capaces de estimular la acumulación de mRNA de los genes c-myc y c-fos, son el PDGF, el EGF y el Factor de Crecimiento para Fibroblastos (FGF) (Bravo, 1985, Kruijer, 1984 y Muller, 1984).

En la mayoría de las líneas celulares de fibroblastos, la progresión tiene una duración aproximada de 12 horas y sólo puede ser detenida en dos diferentes puntos del período G₁

(Murray, 1994, Newport, 1995) El primer punto está regulado por la disponibilidad de nutrientes, es decir que en ausencia de aminoácidos suficientes, la progresión de fase G₁ a S se detiene en G₁; a este punto de restricción en el ciclo celular, se le denomina punto V. Este punto se localiza aproximadamente 6 horas antes de que inicie S (Stiles, 1979). El segundo punto susceptible de control dentro del ciclo celular, es llamado punto W, y se encuentra antes de que ocurra la síntesis de DNA (Wharton, 1982).

Una vez que las células entran en fase S, la síntesis de DNA inicia y los factores de crecimiento parecen ya no ser necesarios. En este momento, el DNA se duplica y se inicia la síntesis de histonas, después de la síntesis de DNA las células entran en fase G₂ del ciclo celular, durante la cual la célula se prepara a mitosis. En este período existe nuevamente un punto específico de control, en el cual la célula puede ser detenida y no continuar el ciclo celular hacia fase M o mitótica. Específicamente se sabe que la mitosis puede ser regulada por una proteína denominada ciclina (Dulic, 1994), ésta a su vez regula a una *cdc2* cinasa que probablemente es la responsable final de la inducción de la mitosis (Weinstein, 1994). El mecanismo de control de la fase G₂ no es conocido, sin embargo, se ha identificado una chalcona que actúa específicamente en la fase G₂ de fibroblastos provenientes de tejido pulmonar (Murray, 1995).

Como puede verse, estas observaciones contemplan aspectos diferentes a los propuestos en el modelo más simple, de progresión y competencia y sugieren por tanto, una nueva perspectiva de los efectos regulatorios ejercidos por los diferentes factores de crecimiento. Este hecho apoya de alguna manera, la interdependencia entre la célula y estos mitógenos que pueden regular los índices de crecimiento neto.

PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS Y FIBROSIS PULMONAR

Estudios de proliferación llevados a cabo en fibroblastos provenientes de lesiones fibróticas tempranas diversas, han sugerido que estos fibroblastos poseen un potencial proliferativo mayor que el de los fibroblastos normales (Jordana, 1988). Esto podría ser resultado de la activación policlonal de tales células, o bien de la presencia de ciertas subpoblaciones de fibroblastos con diferentes características de crecimiento.

Aunque se sabe que los fibroblastos poseen funciones heterogéneas dependiendo de su edad, sitio de origen, y especie de donde provengan (Korn, 1985), en fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar, se ha reportado una gran heterogeneidad en sus

características de crecimiento. Específicamente se ha demostrado que algunas clonas, poseen una capacidad proliferativa aumentada comparada con clonas control (Jordana, 1988).

Estas observaciones sugieren la posibilidad de que en condiciones de inflamación, el microambiente pulmonar permitiera el surgimiento de clonas de fibroblastos de crecimiento rápido, que no sólo pudieran estar involucradas en el desarrollo de un fenómeno de tipo fibrótico, sino que además pudieran ser las responsables del desencadenamiento de este tipo de padecimiento.

En estudios *in vivo* en los que se han proporcionado condiciones semejantes a las que podrían estar presentes en una lesión pulmonar crónica, se ha observado, que toma relativamente poco tiempo a un grupo particular de clonas, alcanzar una masa celular que altere el comportamiento proliferativo de los fibroblastos en forma semejante a lo encontrado en tejido fibrótico. La presencia de fibroblastos con una gran capacidad proliferativa, en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar entonces, podría ser el resultado de anomalías en la respuesta de estas subpoblaciones celulares a factores de crecimiento específicos o bien, al desbalance entre ciertas señales inhibitorias y estimuladoras para la proliferación de fibroblastos en el microambiente pulmonar.

Muchos estudios han demostrado evidencia experimental, que sugiere alteraciones en la modulación de diversos factores de crecimiento en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar. Por ejemplo, se sabe que los macrófagos alveolares obtenidos de pacientes con FPI, poseen niveles incrementados de los mRNAs de PDGF (Nagaoka, 1990) y secretan concentraciones muy elevadas de PDGF e IGF-1 (Martinet, 1987, Rom, 1988). Así mismo, se ha demostrado por ensayos de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, que en las biopsias pulmonares de estos pacientes poseen niveles aumentados del mRNA de PDGF (Antoniasdes, 1990, Viganud, 1991). En un modelo experimental de fibrosis pulmonar, se ha demostrado que los macrófagos alveolares, secretan grandes cantidades del mRNA de la cadena B del PDGF (Kovacs, 1985), y del homodímero PDGF-BB (Fabisiak, 1989, Han, 1992). Por otro lado, también se ha demostrado que los macrófagos alveolares de pacientes con FPI, secretan grandes cantidades de IGF-1 y Fibronectina (Martinet, 1987, Rom, 1988).

Además del efecto inducido por los factores de crecimiento más conocidos, cabe mencionar que existe evidencia experimental, que sugiere la acción de otras moléculas no caracterizadas como factores de crecimiento. Se sabe por ejemplo, que en los pulmones de

pacientes con algunos tipos de fibrosis pulmonar, existe un depósito de fibrina en co-localización con acúmulos de colágena (Fukuda, 1987). Este hecho apoya la hipótesis de la acción de algún factor, presente en la cascada de la coagulación, en el incremento de la síntesis de la colágena. Al respecto se ha demostrado en un modelo animal de fibrosis pulmonar (Tani, 1991), que el crecimiento fibroblástico inducido por lavados broncoalveolares de ratas con pulmones fibróticos, era atribuible al menos parcialmente, a la trombina, factor clave en la cascada de la coagulación y encargado de convertir fibrinógeno en fibrina (Fenton, 1993).

Aunque se ha estudiado más ampliamente el posible efecto estimulador, inducido por los diversos factores de crecimiento en la función fibroblástica (proliferación quimiotáxis, metabolismo de colágena, etc.), se han identificado algunos factores inhibidores del crecimiento fibroblástico, presentes en lavados broncoalveolares de ratas con fibrosis pulmonar inducida con bleomicina (Tani, 1990). Por otro parte en pacientes con FPI, se ha demostrado que células mononucleares muestran una secreción aumentada de TGF β , conocido como inhibidor de la proliferación fibroblástica (Khalil, 1991).

Aunque se conoce el efecto de diversos mediadores en la modulación de la proliferación de fibroblastos en algunos padecimientos de tipo fibrótico pulmonar, existen muy pocos estudios en los que se ha investigado el efecto de las combinaciones de estos mediadores en la proliferación de los fibroblastos. Aunque esto podría resultar muy complejo, sería muy interesante dilucidar los mecanismos de interacción entre citocinas, estableciendo posibles fenómenos de competencia o cooperatividad. Además, probablemente nos acercáramos más a los fenómenos celulares que suceden realmente.

El estado fibrótico resultante de estas anomalías en la proliferación de los fibroblastos modulada por diferentes factores de crecimiento, resulta en una desorganización de la estructura del parénquima pulmonar asociada con desarreglos y cambios en la localización, forma (Bassett, 1987) y tipo de las colágenas pulmonares (Seyer, 1976). Estos cambios se han atribuido, a una reducción en el índice de degradación de las colágenas recién sintetizadas (McAnulty, 1991), o bien a una reducción en la degradación extracelular de las colágenas de la matriz extracelular (Edwards, 1987, Overall, 1989, Shi, 1990).

En esta sección se revisaron algunos conceptos básicos sobre los fibroblastos y los mecanismos involucrados en el control de su proliferación celular, demostrando que algunos

factores de crecimiento pueden tener una influencia importante en la proliferación y quimioatracción de fibroblastos. En la siguiente sección, se revisarán generalidades acerca de las diferentes citocinas conocidas y que influyen la función biológica de los fibroblastos. Así mismo se mencionarán algunas observaciones recientes, acerca del papel de tales factores de crecimiento en el control de la proliferación fibroblástica en la fibrosis pulmonar.

II. MEDIADORES DE ACTIVIDAD FIBROBLASTICA

En la presente sección se revisan brevemente las propiedades de algunos mediadores polipeptídicos, también llamados factores de crecimiento, relevantes en padecimientos tales como la fibrosis pulmonar (Gauldi, 1993, Kovacs, 1994). Estos ya han sido mencionados en la sección anterior, misma en la que se documentó su capacidad como moduladores de una gran variedad de funciones fibroblásticas. Cabe mencionar que debido a que en el presente trabajo, se evaluará el efecto biológico inducido en fibroblastos por la trombina, el TGF β y el PDGF, se hará especial énfasis en los antecedentes, hasta ahora conocidos, de estos tres factores. Esto proporcionará el marco de referencia óptimo, para el mejor entendimiento del planteamiento de las hipótesis y al mismo tiempo facilitará la evaluación de los resultados obtenidos. Un gran número de mediadores han sido caracterizados (Cuadro 1), la mayoría son de origen plopeptídico y afectan la producción de la colágena, estimulando directamente su producción o bien induciendo la quimiotáxis y la proliferación de fibroblastos.

CUADRO 1
EFFECTO DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN FIBROBLASTOS.
PROLIFERACION QUIMIOTAXIS, Y SINTESIS DE COLAGENA.

MEDIADOR	EFFECTO BIOLOGICO	REFERENCIA
EGF	↓ Síntesis de colágena	Kurata y Hata, 1991
ET-1	↑ Proliferación, ↑ Quimiotáxis	Cambrey, 1992 Peacock, 1992
Factor Activador Fibroblastos	↑ Proliferación	Wahl, 1978
Corticosteroides	↓ Síntesis de colágena ↓ Proliferación	Cockayne 1986, Oikannen 987 McCoy, 1980, Postlethwait 1981
Fibronectina	↑ Proliferación, ↑ Quimiotáxis	Bitterman, 1983, Potts, 1994

↓ Disminución ↑ Incremento

MEDIADOR	EFEECTO BIOLÓGICO	REFERENCIA
IGF-1	↑ Síntesis de colágena ↑ Proliferación	Goldstein, 1989 Phillips, 1987, Baserga 1994
Interferón α	↓ Síntesis de colágena ↓ Proliferación	Jiménez, 1984 Duncan y Berman, 1987
Interferón β	↓ Proliferación	Tominaga y Lengyel, 1985
IL-1 (α y β)	↑ Síntesis de colágena ↑ Proliferación	Kahari, 1987, Freshney 94 Singh, 1988,
Interferón γ	↓ Síntesis de colágena ↑ Proliferación	Jiménez, 1984 Hunninghake, 1986
Insulina	↓ Síntesis de colágena	Mauviel, 1991
PDGF	↑ Proliferación ↑ Quimiotáxis	Oliver, 1989 Seppa, 1982
Prostaglandina E_1	↓ Síntesis de colágena	Baum, 1980
Prostaglandina E_2	↓ Síntesis de colágena ↓ Proliferación	Saltzman, 1982 Oliver, 1989
Ácido retinoico	↓ Síntesis de colágena ↑ Proliferación y ↑ Quimiotáxis	Oikarinen, 1987, Dawes, 93 Gray 90 Peppelenbusch 95
TGF- β_1	↑ Síntesis de colágena ↓ Quimiotáxis	Varga y Jiménez, 1987 McAnulty, 91, Osomio, 1993
TNF α	↑ Proliferación ↓ Síntesis de colágena	Mauviel, 1991 Vilcek, 1986

↑ Incremento ↓ Disminución

Los mediadores polipeptídicos son producidos por diferentes tipos de células tales como los macrófagos, los monocitos, los linfocitos, las células epiteliales y endoteliales y los mismos fibroblastos. Estos pueden funcionar como mitógenos solubles, esenciales en los procesos normales de cicatrización y en ciertas patologías como la fibrosis pulmonar.

FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

El PDGF es un mediador de la proliferación y quimiotáxis de los fibroblastos, que ha sido estudiado ampliamente en relación a procesos fibróticos y de cicatrización (Stiles, 1979, Seppa, 1982). Aunque originalmente el PDGF fue aislado de los gránulos α de las plaquetas,

que constituyen su principal sitio de almacenaje, actualmente se sabe que también puede ser secretado por muchas otras células, incluyendo los monocitos (Martinet, 1986), los macrófagos (Shimokado, 1985), las células endoteliales (DiCorleto y Bowen-Pope, 1983), las células vasculares de músculo liso (Walker, 1988) y los fibroblastos (Leof, 1986, Heidin, 1984, Heidin, 1989, Ross, 1990). Las células que poseen receptores para PDGF y que por tanto constituyen células blanco de este factor de crecimiento, son las células del tejido conjuntivo, como los fibroblastos, los condrocitos, las células vasculares del músculo liso, las células endoteliales y algunas epiteliales, las células de la glia y algunas células tumorales (Golub, 1994, Heidin, 1993).

i) ESTRUCTURA

El PDGF es una glucoproteína catiónica y dimerica, que tiene un peso molecular de 30 KDa, está compuesto por dos cadenas polipeptídicas homólogas, unidas entre sí por múltiples puentes disulfuro y denominadas A y B. Aunque algunos hallazgos experimentales han demostrado que el PDGF puede ser encontrado en forma de monómero (Pencev, 1988), generalmente el PDGF se encuentra en cualquiera de tres diferentes formas estructurales: dos homodímeros (PDGF-AA, PDGF-BB) y un heterodímero (PDGF-AB) (Heidin, 1989, 1993).

ii) GENES DEL PDGF

Las dos cadenas polipeptídicas del PDGF A y B, son codificadas por dos genes diferentes, mapeados en diferentes cromosomas y cuya expresión es regulada independientemente (Heidin, 1984, 1989). El gene que codifica para la cadena A, se encuentra en el cromosoma 7 banda q-11.23, posee 7 exones y dos transcritos de 2.8 y 2.3 Kb respectivamente. El gene que codifica para la cadena B es el proto-oncogen c-sis, localizado en el cromosoma 22 banda q12.3 -q13, tiene 6 exones y dos transcritos de 2.8 y de 4.2 Kb (Fen, 1991, Rao, 1988, Heidin, 1993, Rojas-Valencia, 1995).

iii) RECEPTORES DE PDGF

Se conocen dos diferentes tipos de receptores para el PDGF el α y el β , cada uno difiere en su afinidad por las diferentes formas estructurales del PDGF. El receptor α posee una afinidad únicamente por el PDGF-AA, mientras que el receptor β interactúa con todas las formas estructurales del PDGF (Matsui, 1989, Heidin, 1989, Bonner, 1993). Los receptores del PDGF poseen dominios intracelulares con actividad de tirosin cinasa, que se estimula con la unión de PDGF y genera una compleja cascada de señales de transducción (Franke, 1995).

La unión de los diferentes dímeros del PDGF con sus receptores, resulta primeramente en una dimerización y autofosforilación del receptor prerequisite para la asociación y activación de la fosfolipasa C- γ , el fosfatidil inositol 3 cinasa, la proteína activadora de GTPasa, el RAF-1, la movilización de calcio y la activación de la proteína cinasa C (Faller, 1994). Así mismo se activa la expresión de genes de respuesta temprana como el c-myc, c-fos, JE, c-jun, erg-1 y c-ras y una gran variedad de respuestas celulares asociadas a la función del PDGF, como son la estimulación de la proliferación y quimiotaxis de fibroblastos, la inducción de la expresión de otros factores de crecimiento, etc. (Heldin, 1993)

IV) EFECTO BIOLÓGICO DEL PDGF

Aunque los péptidos del PDGF están muy relacionados, inducen un efecto biológico diferente. Estas diferencias se explican en parte, por una mayor concentración de los dímeros y heterodímeros del PDGF. Ejemplo de esto es la actividad quimiotáctica inducida por el PDGF-BB en células de músculo liso (Martinet, 1987), fibroblastos (Seppa, 1982), monocitos y neutrófilos (Deuel, 1982), y la actividad mitogénica inducida en fibroblastos por el dímero AA (Heldin, 1984, Clark, 1989). Además debe considerarse, que cada uno de los diferentes tipos celulares, expresan diferentes concentraciones de receptores en su superficie celular, lo que a su vez, induce respuestas diferentes a cada dímero.

Considerando la importancia de la actividad biológica del PDGF, cabe mencionar la existencia de los posibles mecanismos de regulación de su actividad. La α -2-macroglobulina liberada por MA, es una proteína multifuncional que sirve como inhibidora de endoproteasas y que se caracteriza por su afinidad a citocinas tales como el PDGF, la IL-1 β , el bFGF, el TGF β y el NGF. Estas observaciones sugieren que la α -2-macroglobulina podría ser un importante modulador de la cantidad de PDGF disponible en el microambiente celular, ya que podría regular las concentraciones locales de este factor de crecimiento (Bonner, 1989, 1995).

V) PDGF MEDIADOR DE CICATRIZACIÓN Y FIBROSIS

Como resultado de su papel como potente mitógeno y quimioatrayente para células, el PDGF se ha ligado a los procesos de cicatrización (Senior, 1983, Stiles, 1979, Seppa, 1982). Debe considerarse además que las plaquetas, principal fuente del PDGF, y los MA, que expresan mRNA de las dos cadenas del PDGF (Marinelli, 1991), son unos de los primeros tipos celulares que llegan al sitio de lesión vascular. Así mismo se sabe que los fibroblastos y

las células endoteliales, secretan diferentes formas estructurales del PDGF, capaces de inducir respuestas parácrinas y autócrinas en los mismos fibroblastos (King, 1989).

Por otro lado, existe suficiente evidencia experimental que confirma, que el PDGF desempeña un papel crítico en la patogénesis de un gran número de padecimientos de tipo fibrótico. En modelos animales de fibrosis pulmonar, se ha demostrado que los MA secretan grandes cantidades de PDGF (Kovacs, 1985, 1994). Así mismo, se han observado niveles elevados de PDGF-B y del mRNA del receptor β del PDGF, en el intersticio pulmonar (Fabisak, 1989, Han, 1992). Además se sabe que MA de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI), expresan altas concentraciones del mRNA del PDGF-B (Nagaoka, 1990), y secretan cantidades elevadas de PDGF-BB (Martinet, 1987). Así mismo, en biopsias de pacientes con FPI, se ha observado mRNA de PDGF-B en las células epiteliales, los macrófagos alveolares, intersticiales y en las células endoteliales de capilares (Antoniades, 1990, Viganud, 1991).

Debido a que uno de los capítulos de la presente tesis, se enfocará al estudio de la modulación de la actividad quimiotáctica inducida por el PDGF en fibroblastos de pulmón, y de la expresión diferencial de los genes del PDGF inducida en MA, estimulados *in vitro* por partículas inorgánicas, resulta de gran utilidad conocer las bases de la estructura, genes y el efecto biológico del PDGF, hasta ahora documentado. El conocer los antecedentes y la importancia que tiene el PDGF, en fenómenos de cicatrización y fibróticos, facilitará el entendimiento de los diseños experimentales planteados y la valoración del alcance de los resultados obtenidos.

FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β (TGF β)

El TGF β es un homodímero de 25 KDa formado por dos cadenas polipeptídicas. Generalmente se secreta como una molécula precursora, constituida por el dímero unido a un péptido latente asociado al TGF β , formando un complejo (TGF β -LAP), que requiere ser activado, por ejemplo por plasmina o por algún cambio de pH, para ejercer algún efecto biológico (Massague, 1990).

El TGF β es secretado por plaquetas, macrófagos, monocitos y fibroblastos. Aunque el TGF β , es el más estudiado, se sabe que al menos existen 5 diferentes formas estructurales del TGF β (TGF β_{1-5}), de las cuales sólo el TGF β_4 no se ha encontrado en mamíferos (Khalil,

1991, Assoian, 1987). Aunque el $TGF\beta_2$ y el $TGF\beta_3$ se han identificado en el pulmón, su efecto en fibroblastos no se conoce bien, sin embargo, debido a su localización, ambos factores podrían ser relevantes en la patogénesis de la fibrosis pulmonar (Santana, 1995). El $TGF\beta$ afecta un gran número de funciones celulares, por ejemplo, actúa como un regulador de la síntesis de proteínas del tejido conjuntivo, aumenta la síntesis de colágena, fibronectina (Fine, 1987), los glucosaminoglicanos e inhibe la degradación proteolítica de algunas proteínas de la matriz extracelular (Broekelman, 1991).

Específicamente se sabe que el $TGF\beta$, es un potente estimulador de la síntesis de colágena (Roberts, 1986, Ignatz, 1987, Varga, 1986), que actúa aumentando la producción neta de esta proteína, y afecta diferentes puntos en las vías de su síntesis y su degradación. Se ha postulado que existen diferencias fundamentales entre el receptor tipo I del $TGF\beta$, y los receptores proteína cinasa de las otras citocinas (Wrana, 1992). Además se sabe que estimula la transcripción del gene de procolágena (Raghow, 1987, Ignatz, 1987, Varga, 1987, Penttinen, 1988, Arribas, 1995), incrementa la estabilidad de su mRNA (Raghow, 1987, Penttinen, 1988), disminuye la degradación intracelular de procolágena y limita la degradación de colágena extracelular por inhibición de la producción de colagenasa (McAnulty, 1991), estimulando la producción del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP), el inhibidor del activador del plasminógeno, y la α -2-macroglobulina (Overall, 1981, Shi, 1990).

Además se sabe, que el $TGF\beta$ estimula la producción de inhibidores de metaloproteinasas tales como el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP), el inhibidor del activador de plasminógeno, y la α -2-macroglobulina (Edwards, 1987, Overall, 1989, Shi, 1990). El $TGF\beta$ se ha encontrado presente en los fluidos cicatrizales y se sabe, es responsable de diferentes funciones celulares involucradas en los procesos de cicatrización (Broekelman, 1991, Assoian, 1987).

Aunque el $TGF\beta$, se conoce clásicamente como un inhibidor de la proliferación de las células mesenquimatosas (Moses, 1990) y como un agente quimiotáctico para monocitos y fibroblastos (Postlethwaite, 1987, Laiho, 1992), existe evidencia experimental que demuestra que este factor de crecimiento, puede ejercer un efecto bifuncional en fibroblastos y condrocitos. Así éste puede también estimular *in vitro*, la proliferación dependiendo de las condiciones del cultivo y la concentración empleada (Battergay, 1990, Lyons, 1990). Este efecto dual del $TGF\beta$, ha sido atribuido a una modulación indirecta en la expresión del gen c-

sis del PDGF, quien es en este caso particular, el responsable real de la duplicación fibroblástica (Battergay, 1990, Bonner, 1995). También se sabe, que no induce quimiotaxis en fibroblastos de pulmón de rata y humanos (Osornio-Vargas, 1993). Esta aparente discrepancia demuestra el requerimiento de mayor información acerca del efecto inducido por $TGF\beta_1$, y su comparación con el efecto inducido por cualquiera de las otras formas estructurales conocidas y menos estudiadas.

Pese a que no se conoce el papel específico del $TGF\beta$ en el establecimiento de un proceso fibrótico, si se ha demostrado en pulmones de animales con fibrosis pulmonar, que los niveles del mRNA del $TGF\beta$, están muy elevados (Raghow, 1985, Kelly, 1985, Hoyt y Lazo, 1988, 1989). Así mismo se sabe que en lesiones tempranas, el $TGF\beta$, se localiza en la matriz subepitelial, mientras que en lesiones más avanzadas cambia de localización a macrófagos y a bordes de las áreas de reparación asociadas a hiper celularidad y al depósito de la colágena (Khalil, 1989). Por otro lado, en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, se ha detectado por hibridación *in situ*, la presencia del mRNA del $TGF\beta$, en áreas de enfermedad activa temprana asociada a macrófagos cercanos a fibroblastos que expresan activamente los mRNA de la procolágena tipo I (Broekelmann, 1991), mientras que en áreas de fibrosis densa, el $TGF\beta$, se ha localizado en las células epiteliales peribronquiales y de músculo liso vascular (Khalil, 1991), en comparación con la expresión de este factor en pulmón normal (Broekelman, 1991).

Ante esta cascada de efectos biológicos, resulta preponderante mencionar los posibles mecanismos moduladores de su actividad. Al respecto se sabe que la α -2-macroglobulina es la principal proteína del plasma que se une al $TGF\beta$ (Bonner, 1995). Se piensa que actúa como proteína acarreadora de $TGF\beta$ en suero, liberándolo antes de entrar en contacto con la superficie celular o microambientes celulares ricos en heparán sulfato y proteoglicanos, betaglicanos, fibronectina, colágena tipo IV, decorina y otros componentes de la matriz extracelular que pueden almacenar al $TGF\beta$ en forma activa (McCarfrey, 1989). La liberación del $TGF\beta$ de la matriz extracelular puede realizarla la trombina o la plasmina (Taipale, 1992).

Todos estos antecedentes sugieren la importancia del $TGF\beta$ en la modulación de la respuesta fibroblástica a nivel del metabolismo de colágena, proliferación celular y quimiotaxis inducida en los fibroblastos pulmonares con repercusiones obvias en padecimientos tales como la fibrosis pulmonar. Considerando que uno de los capítulos del presente trabajo se enfocará al estudio del efecto de tres de las diferentes formas estructurales del $TGF\beta$, en

cuanto al metabolismo de colágena, la quimiotáxis y la proliferación de fibroblastos normales y fibróticos, resulta esencial conocer los antecedentes, del TGF β , antes expuestos al respecto y su efecto en fibroblastos normales. Esto permitirá abordar con mayor facilidad los planteamientos realizados y el análisis de los resultados.

LA α TROMBINA

La trombina es una proteasa de serina clave en la cascada de la coagulación. Esta actúa en el último paso del proceso de la coagulación y se encarga de convertir al fibrinógeno en fibrina (figura 2) (Fenton, 1993, Ashton, 1995). Además de su actividad como factor esencial en procesos homeostáticos, se ha demostrado que la trombina estimula la quimiotáxis de monocitos (Bar Shavit, 1983), y macrófagos (Bar-Shavit, 1992), que activa a las plaquetas (Martin, 1985, Hartwing, 1995), y que altera algunas funciones de las células endoteliales y las células del músculo liso (Berk, 1991, Murray, 1995). Por otro lado, se ha demostrado su efecto modulador sobre fibroblastos de pulmón humano, potenciando su proliferación (Chen, 1975, Gray, 1990) y estimulando su quimiotáxis (Dawes, 1993). Además la trombina es capaz de catalizar la

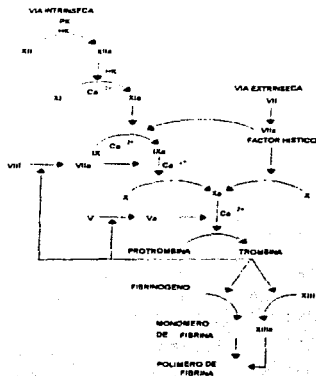


Figura 2. La cascada de la coagulación

ruptura de dos péptidos (fibrinopéptidos A y B) liberados del amino terminal de los dos pares de las cadenas del fibrinógeno A α y B β (Furi, 1990, Esmon, 1987), mismos en los que se ha demostrado una capacidad estimuladora de proliferación fibroblástica (Gray, 1993).

Debido a que en el presente estudio, se pretende analizar el papel de la trombina como modulador de la respuesta fibroblástica en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. A continuación se enfatizarán algunos aspectos generales de la trombina, mismos que evidencian su capacidad de promover la proliferación de células mesenquimatosas y que consecuentemente, determinan su intervención en procesos fibróticos y cicatrizales.

i) MODULADORA DE LA RESPUESTA FIBROBLASTICA

Aunque la α -trombina se sintetiza a partir de la protrombina en las células parenquimatosas del hígado, esta proteasa de serina, también puede ser generada en su forma activa a través de la acción concertada de varias proteínas de la coagulación en la superficie de las células endoteliales (Fenton, 1993, Bar-Shavit, 1992).

El plasma humano normal, contiene suficiente protrombina para generar 150 000 unidades de α -trombina por litro. Pese a que normalmente hay un consumo de más del 80% de la molécula precursora, sólo el 10% de la concentración potencial de α -trombina es activada alguna vez (Ashton, 1995). Este aparente inbalance entre la enzima activa y el consumo de su precursor ha sido explicado por varios procesos. Algunos de estos son por ejemplo, el hecho de que la trombina es secuestrada en su forma activa en los coágulos de fibrina, de donde es liberada en forma activa durante los procesos fibrinolíticos (Lui, 1979), la inactivación de la trombina por inhibidores naturales, presentes en el plasma tales como la antitrombina III y finalmente la unión de la trombina a la matriz de células endoteliales, en donde puede permanecer en forma activa almacenada y protegida de la inactivación de antiproteasas (Bar-Shavit, 1989, 1987).

ii) INDUCTORA DE PROLIFERACION FIBROBLASTICA

Como se mencionó anteriormente, se piensa que la α -trombina desempeña un papel muy importante en diversos procesos, tales como las enfermedades inflamatorias del pulmón, la arterioesclerosis, el remodelado vascular y la cicatrización normal. Aparentemente la habilidad de la trombina como mediador de tales eventos radica, en su capacidad para

promover la proliferación de fibroblastos (Chen, 1975), las células del músculo liso y los macrófagos (Bar-Shavit, 1990).

Otra evidencia experimental que apoya la hipótesis de que la trombina está involucrada en patologías como la fibrosis pulmonar, vía la inducción de la proliferación de los fibroblastos, es el hecho de que pueda ser generada crónicamente en el sitio de lesión, ya sea por la liberación de la enzima secuestrada en el coágulo de fibrina o bien, por la activación continua de las vías de la coagulación en presencia de un endotelio activado (Fenton, 1993, Bar-Shavit, 1992). El mecanismo mediante el cual la α -trombina inicia la proliferación de fibroblastos, no se conoce por completo. Sin embargo, existe evidencia experimental que sugiere que la proliferación de fibroblastos requiere que el receptor celular para trombina esté ocupado via sus dos sitios activos; el de proteólisis y otro sitio de unión de alta afinidad (Bar-Shavit, 1992).

Algunos estudios en los que se ha intentado demostrar el posible mecanismo de inducción de la proliferación fibroblástica por trombina, muestran que el di-isopropilfluorofosfato de trombina (análogo de la trombina, proteolíticamente inactivo), no es capaz de estimular la proliferación de fibroblastos, sin embargo, si es capaz de competir con la α -trombina activa para unirse con su receptores membranales. Al bloquear a la trombina con moléculas mas grandes que el análogo antes mencionado, se ha observado una inhibición del fenómeno de competencia, hecho que sugiere que el sitio de unión de alta afinidad se encuentra muy cercano al sitio activo de la molécula de trombina (Bar-Shavit, 1986).

Por otro lado, se ha postulado la hipótesis de la doble señal de la trombina. Esta sostiene que la primera señal se genera en el momento en el que la trombina se une al sitio de unión de alta afinidad y la segunda, vía la ruptura proteolítica de un sitio alternativo del receptor (Fenton, 1991, 1993). Además, se ha demostrado que la adición de la γ -trombina a cultivos de fibroblastos no es estímulo suficiente para promover la proliferación celular. Sin embargo, la adición de γ -trombina en combinación con di-isopropil-trombina estimula un efecto semejante al inducido por la α -trombina sola, lo que comprueba el efecto complementario de ambos sitios.

Cabe mencionar que los últimos estudios realizados en relación con la inducción de señales de transducción por la trombina, sugiere que se requiere de la activación de más de un receptor para inducir la proliferación de fibroblastos. Estos receptores se han caracterizado

en dos grupos, dependiendo de la naturaleza del sistema de segundos mensajeros que empleen para su activación. El primer grupo comprende a aquéllos receptores que se activan vía la actividad de protein cinasas inducidas por agonistas tales como el PDGF, el EGF y el bFGF y el segundo está compuesto por receptores que son activados vía proteínas G, inducidas por agonistas como la bombesina, la vasopresina y la trombina (Vaouret-Craviani, 1992, Pouyssegur, 1992).

iii) QUIMIOTAXIS INDUCIDA POR LA α -TROMBINA

Por otro lado se sabe que la α -trombina es quimiotáctica para monocitos (Bar-Shavit, 1983), macrófagos, neutrófilos (Bar-Shavit, 1992) y fibroblastos de piel de rata y de prepucio humano (Dawes, 1993). Esta capacidad de la trombina para atraer a células sanguíneas al sitio de lesión vascular, enfatiza el papel de esta proteasa en procesos de iniciación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria y probablemente su relevancia en la patogénesis de la fibrosis pulmonar.

Los mecanismos mediante los cuales la α -trombina ejecuta esta respuesta de tipo quimiotáctico parece no ser enzimática, ya que se ha comprobado que las formas catalíticamente inactivas de la trombina retienen su actividad quimiotáctica. Los receptores de membrana que median la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos, los monocitos y los macrófagos, no se conocen exactamente, aunque se ha determinado que son receptores diferentes a los que median la quimioatracción inducida por los péptidos del tipo F-met-leu-fenil-OH (Bar-Shavit, 1983).

OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO

FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA (IGF-1). El factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) es un polipéptido de 7.6 KDa. Este es producido por diferentes tipos celulares como macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales (Stiles, 1990, Atkinson, 1980). Se ha demostrado que el IGF-1 regula funciones celulares tales como el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo, actuando como un factor parácrino, autócrino y de progresión (Baserga, 1994).

Así mismo, se sabe que el IGF-1 es un potente estimulador de la síntesis de colágena (Goldstein, 1989, Sara, 1991) y de la proliferación de fibroblastos (Phillips, 1987, Stiles, 1979). Se sabe además, que es secretado por macrófagos de pacientes con FPI (Rom, 1988,

Bitterman, 1983) y asbestosis (Rom, 1987) y que se encuentra en concentraciones elevadas en los lavados broncoalveolares de pacientes con esclerosis sistémica (Harrison, 1994, Cambrey, 1992).

La actividad biológica del IGF-1 puede ser modulada, por proteínas de unión denominadas IGFBP. Se han caracterizado seis tipos diferentes de IGFBP (1-6); tres de éstas (IGFBP 3-6) son secretadas por fibroblastos de pulmón fetal humano. Aunque el IGF-1 se encuentra en concentraciones altas en circulación, se encuentra unido generalmente a la IGFBP-3 (complejo de 150 kDa). Esta IGFBP es el principal acarreador del IGF-1 en circulación y consecuentemente el responsable de modular la actividad del IGF-1 manteniendo activa a la molécula en circulación (Price, 1995).

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO Y TRANSFORMANTE α (EGF Y TGF α). El factor de crecimiento epidérmico es un polipéptido de 6 kDa. El EGF es producido por macrófagos y monocitos a partir de un precursor y es un potente mitógeno para células epiteliales y mesenquimatosas (Carpenter, 1979, Arribas, 1995), actúa sinérgicamente con el IGF-1 (Pledger, 1977), el PDGF (Leof, 1982), y la ET-1 (Brown, 1989) promoviendo la proliferación de fibroblastos pulmonares.

El TNF α es un polipéptido de 17 kDa, que es secretado por monocitos y macrófagos, también como molécula precursora (Beutler, 1987, Sherry, 1988, Pennica, 1985). Su producción puede ser inducida por endotoxina y es uno de los factores citotóxicos más potentes que afectan a diferentes líneas celulares tumorales (Sugarman, 1985). Aumenta la adhesión de neutrófilos, su actividad fagocítica y quimiotáctica (Ming, 1987) e induce una gran variedad de otras actividades biológicas incluyendo la modulación de las células endoteliales (Brody, 1986), la función granulocítica, la activación de los macrófagos, etc (Phillip 1986).

El EGF y el TGF α , pertenecen a la misma familia de factores de crecimiento polipeptídicos, ya que poseen una gran homología en su secuencia de aminoácidos. Cada miembro de esta familia se activa vía receptores tirosinasa. El papel de estos péptidos como mediadores de los procesos de cicatrización se ha confirmado con evidencia experimental, en la que se ha observado que queratinocitos de piel y células endoteliales expresan receptores para éstos. En el caso específico del TNF α , incluso se ha demostrado

que el empleo de anti-TNF α es capaz de inhibir el proceso fibrótico pulmonar inducido por la silicio (Piguet, 1989, 1990).

Además de actuar como estimuladores de la proliferación celular, ambos factores son capaces de iniciar y mantener fenómenos de quimiotaxis y angiogénesis (Schreiber, 1986, Postlethwaite, 1990, Kohase, 1987). Se ha documentado una cierta interacción entre ambos factores, ya que el TNF α es capaz de aumentar el número de receptores para EGF en fibroblastos de piel humana (Palombella, 1987).

FACTOR DE CRECIMIENTO BÁSICO PARA FIBROBLASTOS (bFGF). El factor de crecimiento básico para fibroblastos es un polipéptido de 17 KDa, se ha encontrado en macrófagos alveolares (Kjellen, 1991), y se sabe que es producido por fibroblastos. El bFGF puede ser secuestrado por componentes de la matriz extracelular, como el heparán sulfato y los proteoglicanos, mismos que lo protegen de su degradación catalítica y lo almacenan en forma activa por períodos relativamente largos (Benezra, 1993).

Existen dos diferentes formas estructurales del factor de crecimiento para fibroblastos (FGF), el básico y el ácido. Estas se caracterizan de acuerdo a su capacidad para migrar electroforéticamente a través de un gradiente de pH. Aunque cada péptido es codificado por diferentes genes, poseen cerca del 55% de homología (Cardo, 1990). Ambos péptidos son mitogénicos para diferentes líneas celulares de fibroblastos o células endoteliales y son capaces de inducir la síntesis de colágena (Vigny, 1988).

La fuente primaria de bFGF y aFGF es el tejido normal, aunque se ha demostrado que los macrófagos involucrados en procesos de cicatrización son también capaces de liberarlos. El papel fisiológico del FGF no ha sido determinado totalmente (Wiedlocha, 1994), sin embargo, debido a que es un potente mediador de la proliferación de las células endoteliales y la neovascularización, podría estar involucrado en los procesos de cicatrización y fibrosis (Gospodarowicz, 1987).

GLUCOCORTICOIDES ADRENALES. Algunas hormonas esteroideas son empleadas en el tratamiento de diversos padecimientos fibróticos, ya que disminuyen selectivamente la síntesis de colágena, vía la reducción de los niveles de los mRNA traducibles a procólagena (Cutroneo, 1988, Oikarinen, 1987) y además son capaces de reducir la actividad de la

colagenasas . Cabe mencionar que se han descrito un gran número de agentes capaces de disminuir la producción de colágena por mecanismos de regulación transcripcional o post-traducciona (Laurent, 1988, McNulty, 1995).

ENDOTELINA-1 (ET-1). La endotelina-1 es un péptido de 21 aminoácidos, sintetizado por las células endoteliales (Yanagisawa, 1988), epiteliales (Giadi, 1993), macrófagos (Ehrenreich, 1990) y fibroblastos (Zeballos, 1991). Se han identificado tres diferentes péptidos de la endotelina la ET-1, la ET-2 y la ET-3. Diferentes factores de crecimiento, incluyendo al TGF β y la trombina, inducen la producción de ET-1 en las células endoteliales (Cambrey, 1992, . 1994). La endotelina-1 es un mediador que se ha encontrado en concentraciones relativamente altas en el pulmón, y recientemente se ha demostrado que es mitogénico para fibroblastos (Brown, 1989, Takuwa, 1989, Cambrey, 1992, 1994, Peacock, 1992), y células de músculo liso (Komuro, 1988). También se ha reportado como potente agente quimiotáctico para fibroblastos (Peacock, 1992) y como inductor de la producción de colágena (Kahaleh, 1991).

En los LBA de pacientes con fibrosis pulmonar asociada a esclerosis sistémica, en donde existe el antecedente de lesión vascular endotelial, se ha demostrado una alta concentración de endotelina-1 (Hamison, 1991). Más aún se ha demostrado que la endotelina-1, aparentemente cotribuye al incremento de la actividad mitogénica inducida por los LBA de estos pacientes (Cambrey, 1992, 1994).

FIBRONECTINA. La fibronectina es una glucoproteína de 440 KDa sintetizada por una gran variedad de células, incluyendo a los fibroblastos, a las células epiteliales y las endoteliales (Gimeiner, 1995, Potts, 1994). La fibronectina es mitogénica (Bitterman, 1983, Rennard, 1982) y quimiotáctica (Tsukamoto, 1981, Postlethwaite, 1981) para fibroblastos. Además en modelos animales de fibrosis y en pulmones de pacientes con esclerosis sistémica, se ha demostrado que la expresión y la síntesis de esta proteína están elevados (Raghow, 1985, Kelley, 1985, Hoyt y Lazo, 1988, Lazenby, 1990, Wallaert, 1988, Kinsella, 1989).

INTERLEUCINAS. Las interleucinas IL-6, IL-1 β , IL-4 y IL-10 son glucoproteínas liberadas por las células T, los fibroblastos, células tumorales y los monocitos (Gauldie, 1993, Sato, 1994). Estas glucoproteínas son capaz de aumentar la producción de inmunoglobulinas

de las células B (Baumann, 1990) y de inhibir o estimular la proliferación de los fibroblastos (Kohase, 1986). Además se sabe que su producción influye indirectamente en la proliferación fibroblástica, vía la acción de otros factores de crecimiento y la activación de diversas cascadas de transucción (Gauldie, 1993, Lindros, 1995, Freshney, 1994).

INTERACCION ENTRE CITOCINAS

Como se ha demostrado a lo largo de este capítulo, muchos de los factores de crecimiento o citocinas, muestran efectos inhibitorios en la proliferación de ciertos tipos celulares, en tanto que promueven el crecimiento de otros, de esta capacidad de control bidireccional que presentan las citocinas para modular ciertas funciones celulares, se deduce la importancia de su capacidad moduladora en la función fibroblástica y probablemente en el establecimiento de procesos patológicos como la fibrosis pulmonar.

La interacción entre diferentes citocinas es muy compleja, y no se puede predecir su actividad biológica a partir de su comportamiento individual (Tanaka, 1993). Al combinar diferentes citocinas se sobreponen sus efectos, compitiendo por los receptores de membrana de sus células blanco, a las que se unen con alta afinidad y especificidad (Goldstein, 1986). De ahí que actualmente surga una nueva área del conocimiento, dedicada al estudio de la interacción de diferentes factores de crecimiento y sus posibles implicaciones en la modulación de la respuesta celular y en patologías específicas como la fibrosis pulmonar (Robinson, 1993, Tanaka, 1993, Carley, 1993). Algunos ejemplos relevantes de dichas interacciones son la inducción de factores tales como PDGF, TGF β , y el bFGF lograda con trombina (Ohba, 1994, Taipale, 1992), y la muy bien documentada interacción entre PDGF y TGF β (Battergay, 1990, Bonner, 1995).

III. LAS COLAGENAS

Las colágenas son un grupo de proteínas relacionadas que forman la matriz extracelular (Kivinko, 1993, Prockop, 1995). Estas proteínas se agrupan en grandes estructuras supramoleculares que interactúan a su vez, con otros componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, los proteoglicanos, la laminina y el nidogen (Fleischmajer, 1990, Vourio, 1990, Van der Rest, 1990). Los diferentes tipos de colágena proporcionan fuerza tensil e integridad a los tejidos conjuntivos como son el hueso, la piel, el tendón, el cartilago, y la cornea (Niller, 1987, Deak, 1991, Amenta, 1988, Keene, 1988). A la fecha se han identificado 19 tipos diferentes de colágenas, y 30 genes que están involucrados en la

codificación de sus cadenas constitutivas α (Prockop, 1995, Marchant, 1991, Li, 1991, Pan, 1992, Thomas, 1991, Mays, 1992). La organización de la estructura fisicoquímica de cada colágena, le confiere funciones específicas (van der Rest, 1991, Shaw, 1991, 1992, Kivirikko, 1993, McAnulty, 1995, Prockop, 1995).

DISTRIBUCION DE COLAGENAS EN EL PULMON

Varios tipos de colágenas constituyen el principal grupo de proteínas en el pulmón, éstas representan entre el 60 y 65% del tejido conjuntivo en el pulmón humano normal (Timple, 1981, Yamaguchi, 1991, Yoshioka, 1990). Estas proteínas forman una red tridimensional con otras proteínas de la matriz extracelular como la elastina, los glucosaminoglicanos, la fibronectina y la laminina. Estas mantienen la integridad estructural del pulmón y desempeñan un papel crítico en la regulación del factor fenotípico celular. Aproximadamente el 90% de las colágenas presentes en el pulmón son del tipo I y III (Kirk, 1984, Carter, 1991, Cheah, 1982). Estas se encuentran en una razón de 2:1 y se distribuyen principalmente en el intersticio, bronquiolos y en los vasos sanguíneos (Seyer, 1976, Laurent, 1981, Reiser y Last, 1981). En las reacciones de tipo fibrótico en el pulmón, la colágena tipo I es la colágena predominantemente sintetizada.

La colágena tipo VI forma en el intersticio, filamentos finos asociados con las colágenas tipos I y III (Amenta, 1988). El tipo II de colágena es sintetizado por condrocitos y se localiza en la tráquea y en los bronquiolos. Los tipos IX y XI de colágena, se asocian a la colágena tipo II. La colágena tipo IV constituye el principal componente de las membranas basales en alveolos y vasos capilares (Timpl, 1981, Yurachenco, 1984). La colágena tipo V, también se encuentra en membranas basales y se asocia con la colágena tipo I en intersticio (Madri, 1979). El fibroblasto representa un 40% de las células pulmonares y es el principal productor de las colágenas tipo I y III en el pulmón. Sin embargo, otras células como las endoteliales, las epiteliales, las alveolares tipo II y las células de músculo liso también son capaces de sintetizar a las colágenas tipo I y III (McAnulty, 1995, Amenta, 1988).

METABOLISMO DE COLAGENAS

Aunque los primeros estudios desarrollados en el metabolismo de colágena no se enfocaron en el pulmón, éstos sugerían que las tasas de recambio de colágena en la mayoría de los tejidos eran extremadamente bajas (Neuberger, 1951, Neuberger & Slack, 1953, Gerber, 1960, Kao, 1961, Popenoe, 1962, Metivier, 1980). Sin embargo, dichos estudios subestimaban el recambio de colágena, ya que empleaban métodos basados en la medición de aminoácidos

radioactivos y no consideraban la reutilización de isotopos. A partir de estudios en donde se emplaron isotopos reutilizables como el $^{14}\text{O}_2$, se sabe que el recambio de colágena es mas rápido que lo que se creía anteriormente (Jackson, 1974, Molnar, 1986, Laurent, 1986, McAnulty, 1987).

Dicho proceso de modulación en la cantidad de colágena que se deposita en el pulmón, es controlado mediante un balance entre su síntesis y su degradación. La síntesis es regulada a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional, mientras que la degradación se regula por medio de enzimas del huesped y sus inhibidores (Mays, 1992, Sandell, 1990, Yamada, 1980, Thomas, 1991). El inapropiado control de este balance, puede incrementar el depósito de colágena, e iniciar el establecimiento de un proceso de tipo fibrótico (Laurent, 1986, Korn, 1989, McAnulty, 1995)). Cualquier alteración en cantidad, estructura, geometría o distribución de las colágenas puede alterar la función pulmonar.

h) SINTESIS

Las cadenas α de la colágena tipo I y otras colágenas no fibrilares, son sintetizadas como moléculas precursoras (pre - pro - α), que sufren un proceso post-traduccional muy complejo. Dichas moléculas contienen un péptido señal, una región central helicoidal y dos dominios globulares NH_2 y COOH terminal conocidos como propéptidos N y C. Dos cadenas pro $\alpha 1(I)$ y una cadena pro $\alpha 2(I)$, interactúan a nivel del C-propéptido y forman una triple hélice. Posteriormente la hélice sufre una ruptura extracelular con peptidasas específicas, desprendiéndose la mayor parte del propéptido N - terminal y el C -terminal. La función del N - propéptido no se conoce completamente, sin embargo, se piensa que puede tener algún papel en la regulación del diámetro de la fibra de colágena o bien, estar involucrado en la modulación por retroalimentación de la síntesis de procolágena (Van der Rest, 1991).

h) DEGRADACION

Cuando las moléculas de colágena dejan a la célula, sus uniones intramoléculares son más estables y por tanto, son menos susceptibles a la degradación. Contrariamente a esto, las moléculas de procolágena son mas susceptibles. Las vías de degradación de colágena son muy complejas y todavía no han sido entendidas completamente, sin embargo, se han identificado varios sitios potencialmente importantes de ruptura (intra y extracelularmente).

DEGRADACION INTRACELULAR

En algunos tejidos, incluyendo al pulmón, se ha observado una degradación intracelular rápida de las colágenas recién sintetizadas (Bienokowski, 1978a, Laurent y McAnulty, 1983, McAnulty y Laurent, 1987, Dehm y Prockop, 1972, 1973, Grant, 1972). Estudios *in vitro* han demostrado que entre el 10 y el 40% de la procolágena sintetizada por los fibroblastos, es degradada intracelularmente en pocos minutos, dependiendo de las condiciones del cultivo (Rennard, 1982, Bienkowski, 1978a, 1978b). Por otro lado en estudios *in vivo*, se ha demostrado que en animales jóvenes se degradan cerca del 30% de las colágenas pulmonares, mientras que en animales viejos, donde se sintetiza una mayor proporción de colágenas inestables o defectuosas, se incrementa la degradación hasta en un 80% (Mays, 1989, Berg, 1986).

Estudios desarrollados para dilucidar el mecanismo mediante el cual la procolágena es degradada intracelularmente, han sugerido la existencia de dos vías de degradación. Una en la que se lleva a cabo la degradación de las moléculas de procolágena defectuosas, denominada degradación aumentada, y otra denominada degradación basal (Berg, 1986). En la primera de éstas actúan diferentes enzimas (lisosimas, catepsinas B, D y L) capaces de degradar a moléculas de procolágena no helicoidales (Berg, 1986, Bienkowski, 1978a, 1978b). En la vía de degradación basal en cambio, se sucede una degradación intracelular continua de procolágenas de triple hélice por proteasas; probablemente el sitio celular de este tipo de degradación esté entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, en su región trans-Golgi (Bloblel, 1977, Barile, 1990).

DEGRADACION EXTRACELULAR

Se piensa que este tipo de degradación es mediada por metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Quince MMPs han sido identificadas (Abramson, 1995) incluyendo tres formas de colagenasas (Freije, 1994), tres gelatinasas que incluyen a la más recientemente descrita, que se encontró asociada a membrana (Sato, 1994) y vanas estromelisininas (Murphy, 1992, Woessner, 1991). Las colágenas intersticiales producidas por los fibroblastos son las más específicas para la ruptura de la triple hélice en forma nativa y actúan entre las uniones glicina - leucina y glicina - isoleucina (Harris, 1984).

La susceptibilidad de la colágena a la degradación colagenolítica es influenciada por su tipo, localización anatómica, la edad del tejido, la presencia de proteoglicanos y hialuronidasa (Harris, 1984). Algunas otras condiciones que también afectan la degradación de colágena son: la secreción de sustancias que estimulen la producción de colagenasas, o bien que compitan con los

sitos de unión de las MMPs. La actividad de las MMPs es regulada por inhibidores tales como la α -2-macroglobulina y los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) (Matrisian, 1990).

REGULACION DEL METABOLISMO DE COLAGENA

Las anomalías en el depósito de la colágena, han sido atribuidas al desbalance entre su síntesis y su degradación (Laurent, 1986, McAnulty, 1995). En la fibrosis pulmonar específicamente, este desequilibrio se ha atribuido a la cantidad de colágena producida en exceso ya sea por las células en forma individual o bien por un decremento en la degradación de la colágena (McAnulty, 1995).

Para entender la regulación del metabolismo de esta proteína de matriz extracelular, deben considerarse dos aspectos importantes, el que incluye a los cambios en las células que sintetizan a la colágena en el pulmón, es decir los fibroblastos pulmonares, principales productores de la colágena pulmonar, y los cambios en la modulación de la biosíntesis y degradación de la proteína en sí misma. En cuanto a los fibroblastos, se ha postulado que éstos son quimioatraídos al sitio de lesión pulmonar, y que al aumentar su número, aumenta la fuente potencial de colágena en el pulmón. Otras teorías sugieren que el aumento en la proliferación fibroblástica, inducida por la presencia de diversos factores de crecimiento, o bien la selección clonal de una subpoblación de fibroblastos con fenotipo específico de replicación rápida, redundan en una alta producción de colágena (McAnulty, 1995). Al respecto debe destacarse el hecho de que normalmente, se ha estudiado el papel que desempeñan los estimuladores de la proliferación fibroblástica en la fibrosis pulmonar, sin embargo, podría resultar importante el estudio de deficiencias en la regulación de un inhibidor que se exprese constitutivamente, hecho que prácticamente no se ha considerado y que podría resultar relevante en investigaciones futuras.

En cuanto a la biosíntesis de la colágena, en los últimos años se ha dado especial énfasis al estudio de las enzimas involucradas en la síntesis de las colágenas y que modifican post-traduccionalmente a esta proteína de matriz extracelular. Debido a su especificidad, estas podrían ser el blanco ideal para inhibir el depósito de colágena en la fibrosis pulmonar, tal es el caso de la prolil-4-hidroxilasa, la c-proteinasa y las lisil-oxidasas y lisil-hidroxilasas (Prockop, 1995). Aunque se ha identificado al 2,4-dicarbóxilato de piridina como inhibidor de la 4-hidroxilasa, éste no es capaz de atravesar la membrana celular. En cuanto a la c-proteinasa que debe cortar a la procolágena para que pueda ser ensamblada en fibras, se han sintetizado mutantes de procolágena que no poseen sitio de ruptura para la c-proteinasa, sin embargo estas mutantes, no han sido capaces de generar el ensamblaje de las fibras de colágena (Prockop, 1990). En cuanto a los inhibidores de la

lisil-hidroxilasa y la lisil-oxidasa, se han identificado inhibidores tales como el minoxidil y el β -aminopropionitrilo como potentes inhibidores de sus actividades enzimáticas y de la síntesis de sus mRNA, sin embargo se desconoce su mecanismo de acción.

Por esto existe un gran interés en dilucidar los mecanismos de regulación de la expresión de los genes estructurales de la procólágena. Al respecto cabe mencionar que existe evidencia experimental que sugiere la importancia de los factores cis-reguladores, y de diversos factores de transcripción implicados en la biosíntesis de colágena, aunque todavía existe un conflicto entre los resultados obtenidos en diferentes construcciones génicas y las pruebas realizadas en ensayos con ratones transgénicos (Prockop, 1995).

Como sitios potenciales de inhibición o modulación de la síntesis de colágena, se han estudiado ampliamente la transcripción génica y la traducción de los mRNA (McAnulty, 1995). Especial énfasis se ha dado a dos estrategias de estudio, el empleo de oligonucleótidos antisentido (Olsen, 1991), y genes antisentido (Vitto, 1989), que inhiben específicamente la síntesis de colágena. Sin embargo, no se ha logrado una inhibición mayor del 50%, y estos hallazgos resultan controversiales al compararlos con respecto a lo que se ha observado *in vitro* y en ratones transgénicos que tienen deletado el minigen de la COL1A1 (Prockop, 1989). Debido a esto se requiere una mayor profundización en esta área del conocimiento, a fin de dilucidar como se lleva a cabo realmente la regulación del metabolismo de colágena a nivel génico.

COLAGENA Y FIBROSIS

Aunque en cultivos de fibroblastos de pacientes fibróticos, se ha observado una acumulación aumentada de colágena, los índices de la síntesis de colágena se han encontrado normales. En pacientes con fibrosis pulmonar, este hecho se ha explicado de dos diferentes formas, por una disminución del nivel de colagenasa, comprobado en fibroblastos y LBA de estos pacientes (Selman, 1986, Selman, 1991) Sin embargo, controversialmente también se ha reportado un incremento en la capacidad de degradación exógena de la colágena, en LBA de pacientes con FPI (Gadek, 1979). Por otro lado, se ha demostrado una reducción en la degradación de las colágenas recién sintetizadas (Laurent, 1983, McAnulty, 1991), y un incremento de las actividades de las enzimas proil-hidroxilasa y lisil-oxidasa (Kelley, 1980).

Esta información, sugiere que el incremento en la producción de colágena atribuible a los fibroblastos, es uno de los mecanismos mediante el cual la colágena se deposita en exceso en los pulmones de los pacientes con fibrosis pulmonar. Sin embargo, debe considerarse además, la

influencia de diversos factores de crecimiento, potencialmente moduladores del metabolismo de las colágenas *in vivo* como el TGF β (McAnulty, 1995), entre otros. Debido que en dos de los capítulos del presente trabajo, se evaluará la modulación del metabolismo de colágena, inducido por dos factores de crecimiento, y en uno de los dos casos se evaluará la modulación inducida a nivel génico, la información anteriormente proporcionada será de gran utilidad.

IV. FIBROSIS PULMONAR.

DEFINICION. La fibrosis pulmonar es el estadio final de un grupo de padecimientos, que tienen en común alteraciones cuali y cuantitativas en el depósito de colágena dentro del parénquima pulmonar (Madri y Furthmayr, 1980, Seyer, 1976, Fulmer, 1979). En el pulmón normal la pared alveolar es muy delgada, mientras que durante un padecimiento fibrótico, esta pared se engruesa debido a la gran cantidad de colágena que se deposita en forma desorganizada en este tejido.

Las causas de la fibrosis pulmonar pueden ser diversas, ésta puede resultar de lesiones pulmonares específicas como la característica del síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva del adulto, de la inhalación de partículas inorgánicas (asbestosis, etc.), o bien, puede ser inducida por sustancias químicas (el paraquat, la bleomicina, el metotrexate, etc.), por irradiación, o por daño oxidativo pulmonar. Alternativamente, la causa de la fibrosis pulmonar puede ser desconocida, tal es el caso de la fibrosis pulmonar idiopática, también llamada alveolitis fibrosante criptogénica, y la fibrosis pulmonar asociada a esclerosis sistémica y la sarcoidosis. Cabe destacar que en la mayoría de los casos, el padecimiento fibrótico terminal es muy semejante en todas las enfermedades pulmonares intersticiales (Crystal, 1981, 1991, McAnulty, 1995).

Debido a que durante el desarrollo del presente trabajo se analizará la modulación fibrilística inducida por agentes con actividad de factor de crecimiento, presentes en muestras de LBA de pacientes con diferentes tipos de fibrosis (FPI, asociada a ES y sarcoidosis), a continuación se revisarán brevemente algunas de las principales características de dichos padecimientos.

FIBROSIS PULMONAR INTERSTICIAL

Aunque se han identificado mas de 130 diferentes enfermedades pulmonares de tipo intersticial (Fulmer y Crystal, 1979), éstas se pueden subdividir en dos categorías, de acuerdo a su etiología. En las primeras se desconoce al agente etiológico, constituyen cerca de un

65%, e incluyen padecimientos tales como la esclerosis sistémica, la displasia broncopulmonar, la alveolitis fibrosante criptogénica o fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la sarcoidosis y algunas otras enfermedades vasculares que afectan la síntesis de colágena en el parénquima pulmonar. El segundo tipo de enfermedad pulmonar intersticial, lo constituyen aquéllos padecimientos en los que se conoce su etiología. Comprenden aproximadamente el 35% e incluyen a la mayor parte de las fibrosis ocupacionales causadas por la inhalación de partículas inorgánicas, microorganismos infecciosos u otros agentes tóxicos ambientales.

1) FIBROSIS INDUCIDA POR INHALACION DE PARTICULAS INORGANICAS

Las enfermedades fibróticas pulmonares intersticiales, inducidas por la inhalación de partículas inorgánicas, también llamadas neumoconiosis, están ampliamente documentadas en exposiciones de tipo ocupacional (Mosman, 1989). Al respecto se sabe claramente que algunas de las partículas inorgánicas que se depositan en el pulmón, tienen efectos mínimos (hierro), mientras que otras presentan diferentes grados de patogenicidad (asbesto, cuarzo, etc). Sin embargo, cabe mencionar que se han reportado algunos casos, en donde las neumoconiosis se relacionan con exposiciones no ocupacionales a polvos naturales (Brambila, 1979, Sherwin, 1979, Osomio-Vargas, 1980, y 1991).

En los casos en los que se tiene una clara evidencia del potencial citotóxico de partículas específicas, los mecanismos iniciales en la génesis de este tipo de padecimientos, a nivel celular o subcelular, no han sido determinados completamente. Sin embargo, a partir del desarrollo de modelos experimentales, se ha establecido la importancia de los macrófagos alveolares en el desarrollo de este tipo de padecimientos (Adamson, 1995). Específicamente se sabe que estas células se acumulan en el sitio de depósito de las partículas, y se activan secretando potentes factores de crecimiento que pueden tener un papel fundamental en el establecimiento y progresión del proceso inflamatorio, quien finalmente desencadenará en una fibrosis pulmonar. Algunos ejemplos de los factores de crecimiento producidos por los macrófagos alveolares, después de su estimulación *in vitro* con partículas inorgánicas, son los metabolitos del ácido araquidónico que estimulan la síntesis de colágenas I y III, el PDGF y algunas interleucinas que estimulan la duplicación fibroblástica, etc.

11) FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA (FPI)

La fibrosis pulmonar idiopática, se caracterizan por una alveolitis muy temprana y persistente que precede a la acumulación intersticial de componentes de la matriz extracelular,

principalmente colágena, lo que finalmente conlleva a la destrucción de la estructura alveolar culminando en una fibrosis (Harrison, 1991).

Una de las características principales de la FPI, es la infiltración celular a espacios alveolares e intersticiales, donde predominan los linfocitos, los eosinófilos, las células plasmáticas, los fibroblastos y otras células de origen mesenquimatoso. Una de las contribuciones más importantes a nuestro entendimiento del incremento en el número de células mesenquimatosas, en las fases tempranas de la FPI, lo constituye indudablemente, el descubrimiento de que los macrófagos alveolares de pacientes con FPI, liberan espontáneamente diversos factores de crecimiento y mediadores de actividad biológica como el PDGF, el bFGF, la fibronectina, el IGF-1, etc. (Martinet, 1987, Antoniades, 1990, Peacock, 1992).

///) FIBROSIS PULMONAR ASOCIADA A ESCLEROSIS SISTEMICA

La esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad sistémica de etiología desconocida. Esta se caracteriza por el incontrolado depósito de colágena y otros componentes del tejido conjuntivo, asociado a una lesión arterial que produce obstrucción vascular y atrofia isquémica en la piel y órganos internos. La esclerosis sistémica se manifiesta principalmente, en los sistemas vascular, cutáneo, músculo-esquelético, gastrointestinal, pulmonar, cardíaco y renal. Al padecimiento cutáneo de la esclerosis sistémica, se le denomina comunmente esclerodermia. La ES se asocia muy frecuentemente al fenómeno de Raynaud, que se manifiesta como una palidez episódica de los dedos, nariz, y oídos (Harrison, 1990, Harrison, 1991). En el 80% de los pacientes con ES, los pulmones están involucrados en el padecimiento, lo que daña severamente su función fisiológica y explica el hecho de que la fibrosis pulmonar asociada a la esclerosis sistémica, sea la principal causa de muerte en estos pacientes (Le Roy, 1988). A diferencia de otros tipos de fibrosis, la asociada a ES se diagnostica antes de que las anomalías pulmonares se hagan aparentes (Steen, 1990). Esto se debe a que la manifestación en piel y el fenómeno de Raynaud, se presentan en forma temprana. Este hecho brinda la gran oportunidad a los investigadores de estudiar en estos pacientes, los eventos tempranos asociados a un fenómeno de fibrosis pulmonar (Mødsger, 1971, Kurtand, 1969, Michet, 1985). La información obtenida de tales estudios, es relevante no solamente para los pacientes con ES, sino también para los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, ya que las anomalías estructurales que se presentan en ambos padecimientos son indistinguibles (Harrison, 1991).

El mecanismo de patogénesis de la ES se desconoce, sin embargo, las observaciones de que la lesión vascular y el infiltrado de células inflamatorias acompaña al depósito de colágena en la piel, ha permitido la elaboración de dos diferentes hipótesis para explicar la patogenia de la ES (LeRoy, 1988). En la primera de éstas, se considera la activación fibroblástica como un evento clave y es denominada hipótesis vascular y propone concretamente, que una lesión vascular precede e inicia la activación fibroblástica y la infiltración de células del sistema inmune. La segunda hipótesis denominada inmune propone que una anomalía inmunológica inicia la activación fibroblástica e induce la lesión vascular. La hipótesis inmunológica, se apoya en el hecho de que comúnmente se detectan auto-anticuerpos contra factores anti-nucleares en ES (Silver, 1988). Sin embargo, también se ha sugerido que las anomalías celulares reportadas pueden ser el resultado de la enfermedad más que su causa.

Debido a que se ha sugerido que eventos tempranos en la fibrosis pulmonar asociada a ES involucran a las células endoteliales, y conducen al trasudado vascular, permitiendo el flujo de células inflamatorias en el área de lesión específica (Campbell, 1975), se ha propuesto una tercera hipótesis que incorpora a las dos anteriores (Claman, 1989). En ésta se ha sugerido que los mastocitos que se observan en fenómenos de hiperplasia en pacientes con escleroderma, se activan y son éstos los responsables de la liberación de mediadores que pueden estimular la migración y proliferación de los fibroblastos (Hawkins, 1985). Al respecto se ha demostrado que las células T y los macrófagos, están activadas en los pacientes con escleroderma (Kahaleh, 1989) y que pueden secretar al medio activadores de mastocitos tales como la interleucina 1, 3 y 4 (Brown, 1989), el TGF β (Kehrl, 1986), y el factor de crecimiento linfocítico para fibroblastos (Wahl y Gately, 1983; Lobb, 1988; Thuesen, 1979). Por otro lado se sabe que las plaquetas también pueden interactuar con el endotelio dañado secretando PDGF y TGF β . A partir de esto se puede concluir entonces, que las células T, los macrófagos y las plaquetas pueden influenciar el comportamiento de las células endoteliales y los mastocitos, y que éstos a su vez pueden modular subsecuentemente el comportamiento de los fibroblastos a través de factores de crecimiento.

IV) FIBROSIS PULMONAR ASOCIADA A SARCOIDOSIS

La sarcoidosis es un padecimiento multisistémico y de etiología desconocida, que se caracteriza por la presencia de lesiones granulomatosas, células gigantes multinucleadas y la infiltración de linfocitos y fagocitos mononucleares en los tejidos afectados. (Scadding, 1985).

Aunque el pulmón está involucrado en la progresión de la respuesta inflamatoria inicial hacia la fibrosis pulmonar, y en algunos pacientes constituye un factor preponderante en la morbilidad y mortalidad de este padecimiento (Harrison, 1991, Thomas, 1987), debe mencionarse el hecho de que este padecimiento, es menos fibrosante que la FPI y la fibrosis pulmonar asociada a ES (Harrison, 1991).

Algunas teorías que han intentado explicar la patogénesis de la sarcoidosis, postulan que durante las reacciones inflamatorias inducidas por algún agente antigénico desconocido, se estimula a macrófagos y linfocitos a liberar factores de crecimiento como la IL-2 (Saltini, 1986). Las células T de pacientes con sarcoidosis, que presentan receptores específicos para esta citocina muestran un incremento en su proliferación. Estas células T activadas liberan a su vez factores quimiotácticos para monocitos (Hunninghake, 1980) y factores inhibidores de la migración de macrófagos, tal como el IFN γ (Robinson, 1985), y el TNF α que modulan la expresión de la colágena (Elias, 1988). Aunque estas interacciones explican la apariencia morfológica de las reacciones inflamatorias en las lesiones de sarcoidosis, el mecanismo que explica el depósito excesivo de colágena es desconocido. Estos datos sugieren que existe un balance a favor de la secreción de mediadores que estimulan la proliferación de fibroblastos y la producción de colágena (Harrison, 1991).

PATOGENESIS.

Independientemente de que el agente etiológico causante de la fibrosis pulmonar sea o no conocido, se piensa que los mecanismos de patogénesis, son comunes en los diferentes tipos de fibrosis, ya que en la mayoría de éstos, se presenta una reacción inflamatoria con edema, la presencia de un infiltrado celular asociado a lesión celular endotelial y epitelial, así como la liberación de algunos factores de crecimiento, como eventos que preceden al desarrollo de una fibrosis (Harrison, 1994).

Las teorías actuales con respecto a la patogénesis de la fibrosis pulmonar, postulan que existe una serie de mediadores polipeptídicos, que desencadenan el fenómeno fibrótico. Estos mediadores son secretados por células residentes del pulmón (fibroblastos, células epiteliales y endoteliales), o bien por células provenientes de la circulación (macrófagos, neutrófilos, linfocitos, etc). Dichos mediadores polipeptídicos modulan una gran variedad de funciones biológicas en los fibroblastos, como su atracción al sitio de lesión específico, su

proliferación y la producción de cantidades excesivas de colágena (Crystal, 1981, Laurent, 1988, Elias, 1985, Bitterman, 1982, Wahl, 1978, Jimenez, 1979, Richards, 1991, Phan 1995).

Estas teorías concuerdan con hechos tales como que, los fibroblastos comprenden cerca del 40% de las células del intersticio pulmonar y son los principales productores de colágena en el pulmón (Bradley, 1980). Además existe evidencia experimental que apoya esta hipótesis, ya que es característico de algunos tipos de fibrosis pulmonar, la gran permeabilidad microvascular asociada a lesión celular endotelial, hecho que permite el flujo de células y mediadores polipeptídicos al pulmón (Laurent, 1986, McNulty, 1995). Sin embargo, no debe descartarse el hecho de que algunos mediadores pueden ser producidos localmente (Crystal, 1981, 1990). El incremento en el depósito de colágena puede ocurrir por diferentes mecanismos. Como ya se mencionó anteriormente, los fibroblastos del pulmón son los principales productores de colágena, así que indirectamente el aumento en la síntesis de colágena, puede atribuirse al incremento en el número de fibroblastos o bien al aumento en su proliferación o bien por alteraciones en la regulación del metabolismo de colágena.

Por análisis bioquímico y técnicas inmunohistoquímicas, se ha identificado en tejido fibroso colágena del tipo I, sin embargo, en áreas de fibrosis temprana el tipo III de colágena es el predominante (Bateman, 1981, Seyer, 1976, Last, 1983, Kirk, 1984). Este incremento en la concentración de colágena pulmonar se ha observado en diferentes tipos de padecimientos fibróticos como el síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva del adulto (Zapol, 1979, Collins, 1984), y la fibrosis pulmonar idiopática (Kirk, 1986, Selman, 1988). Indirectamente, también ha sido determinado el incremento en la síntesis de colágena, ya que se han observado concentraciones elevadas de péptidos de procolágena en los LBA de pacientes con FPI (Low, 1983, Cantin, 1988, Bjerner, 1989), esclerosis sistémica (Hamison, 1990) y sarcoidosis (Low, 1983, Bjerner, 1986).

Sin embargo, se ha observado que los fibroblastos de pacientes con FPI o ES no sintetizan una mayor cantidad de colágena en comparación con controles (Raghu, 1989, Hamison, 1991). Esta aparente discrepancia entre la evidencia experimental y las teorías antes expuestas, se podría explicar por la existencia de una activación local, que induce la expresión de los genes de colágena en áreas específicas. Este hecho explica el porque los fibroblastos provenientes de algunas biopsias de pacientes con FPI, sintetizan grandes cantidades de colágena y otros no (Broekelmann, 1991).

Las alteraciones en los procesos de degradación de la colágena han sido menos estudiados en humanos, sin embargo, se han reportado niveles altos de colagenasa en LBA de pacientes con FPI (Gadek, 1979) y controversialmente una disminución de la actividad colageolítica en LBA de pacientes con FPI pero con un incremento en el índice TIMP/colágenasa en fibroblastos de pacientes fibróticos (Pardo, 1992). Por otro lado se sabe que los macrófagos de pacientes con sarcoidosis activa, son capaces de secretar grandes cantidades de colagenasa para colágena tipo IV (Agostini, 1989); y que en pacientes con FPI, el incremento en el contenido de colágena pulmonar se relaciona, al menos en parte, con el decremento de la actividad colagenolítica (Seiman, 1986).

CAPITULO 2

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Como se mencionó en la sección de antecedentes, en estudios previos se ha demostrado que la actividad biológica de los fibroblastos, puede ser modulada por diferentes factores de crecimiento. Estos son clave durante la patogénesis de la fibrosis pulmonar, ya que se ha observado su presencia en áreas fibróticas, y se han determinado sus posibles fuentes generadoras en el pulmón. Debido a esto, se ha postulado la existencia de un posible nexo entre dichos factores y la actividad biológica inducida por los fibroblastos, lo que podría entenderse entonces, como fundamental durante los mecanismos del establecimiento de una fibrosis pulmonar.

Pese a que la evidencia experimental, señala a la modulación biológica inducida por diferentes factores de crecimiento, como esencial para el entendimiento de un fenómeno fibrótico, no existen estudios en los que se investigue la presencia de mediadores, relativamente "nuevos" como la trombina, en muestras del fluido que cubre el epitelio pulmonar de pacientes con diferentes tipos de fibrosis y el posible efecto inducido por éstos en fibroblastos pulmonares. Cabe mencionar que tampoco se ha determinado el efecto de estos factores de crecimiento en fibroblastos de pulmón normal, comparando el efecto inducido en fibroblastos pulmonares provenientes de pacientes con fibrosis, o bien, se ha intentado establecer, si la modulación fibroblástica se lleva a cabo a nivel génico, en que tiempo, y si existe o no alguna correlación con la secreción de proteína y su actividad biológica.

Por lo tanto como hipótesis general para el desarrollo del presente trabajo se consideró, que mediadores polipeptídicos como la α -trombina, pura y presente en muestras de LBA de pacientes con fibrosis pulmonar, el TGF β_1 , y dos de sus formas estructurales menos estudiadas (TGF β_2 y TGF β_3) y el PDGF, y sus tres dímeros -AA, BB y -AB, modulan la respuesta biológica de fibroblastos pulmonares, a nivel de proliferación, quimiotáxis y metabolismo de colágena. Así mismo se postula que si esta regulación es alterada por agentes externos o bien agentes internos (desconocidos), esto podría repercutir en el establecimiento del proceso fibrótico pulmonar.

A fin de facilitar el entendimiento del presente trabajo, la presentación del mismo, se subdividió en capítulos diferentes. En cada uno de éstos se incluyó el estudio de un factor de crecimiento diferente. El capítulo 3 se enfocó a la determinación del efecto biológico inducido *in vitro* por la α -trombina, pura y presente en muestras de LBA de pacientes con fibrosis pulmonar, en la actividad biológica de fibroblastos de pulmón humano. En el capítulo 4 se

muestra la evaluación del efecto biológico inducido *in vitro* por tres de las diferentes formas estructurales del TGF β , en la actividad biológica de fibroblastos de pulmón humano normal y provenientes de pacientes con diferentes tipos de fibrosis. Finalmente el capítulo 5 se destinó, a la determinación de la posible modulación diferencial inducida en la quimioatracción de fibroblastos pulmonares por cada una de los dímeros del PDGF. Así mismo y considerando que el PDGF puede ser secretado por MA, e inducir su expresión a nivel génico, se empleó un modelo experimental *in vitro*, en el que se evaluó el patrón de expresión génica de cada una de las cadenas polipeptídicas del PDGF en MA estimulados con partículas inorgánicas a través del tiempo.

CAPITULO 3

MODULACION DE LA RESPUESTA FIBROBLASTICA INDUCIDA POR TROMBINA

El 80 % de los pacientes con ES desarrollan fibrosis pulmonar, caracterizada por un incremento en la proliferación de los fibroblastos pulmonares y el depósito de proteínas de la matriz extracelular (Leroy, 1988). Para el desarrollo del presente trabajo, se consideró que el daño endotelial característico de este padecimiento (Silver, 1988, Harrison, 1990), permitía que mitógenos provenientes de la circulación, como la α -trombina recientemente reportada como mitógeno y quimioatrayente de fibroblastos (Gray, 1990, Bar-Shavit, 1992, Dawes, 1993, Cambrey, 1994), entren al pulmón y sean los responsables de la proliferación de fibroblastos pulmonares (Harrison, 1993). Los estudios se realizaron en pacientes con otros tipos de fibrosis: FPI, sarcoidosis y voluntarios normales que se emplearon como control.

HIPOTESIS GENERAL. En la fibrosis pulmonar asociada a ES, la lesión pulmonar en endotelio permitirá la movilización de la α -trombina desde la circulación hasta el intersticio pulmonar y ésta será la responsable de la proliferación de los fibroblastos y de su activación para producir excesivas cantidades de colágena.

HIPOTESIS ESPECIFICAS

- Si en los pacientes con esclerosis sistémica, sarcoidosis y fibrosis pulmonar idiopática, existe evidencia de lesión vascular y trasudado de la circulación, reportado por la presencia de edema e influjo celular, se esperaría encontrar trombina presente en los LBA de estos pacientes.

- Si la trombina induce *in vitro* proliferación celular en fibroblastos, se esperaría que los LBA de pacientes con ES, sarcoidosis y FPI que contengan trombina, indujeran estimulación celular en fibroblastos de pulmón humano y que fuera la trombina la responsable, al menos en parte, de dicho efecto biológico.

- Si se postula que la trombina puede ser importante en el establecimiento del proceso fibrótico pulmonar, se esperaría que ésta pudiera tener algún efecto *in vitro* en el metabolismo de la colágena de los fibroblastos pulmonares.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la presencia del mediador trombina en muestras de LBA de pacientes con diferentes tipos de fibrosis pulmonar (ES, FPI y sarcoidosis), empleando un método colorimétrico y un sustrato específico. Confirmar el resultado por Inmunoelctrotransferencia, empleando un anticuerpo específico dirigido contra este mediador. Comparar los resultados con la presencia de trombina en LBA de voluntarios sanos.
2. Investigar la capacidad de la trombina pura y presente en muestras de LBA de pacientes con fibrosis pulmonar de diferentes tipos, para estimular la proliferación de los fibroblastos pulmonares, mediante un método que permite evaluar *in vitro* a los moduladores del crecimiento fibroblástico.
3. Evaluar la contribución específica de la trombina presente en LBA de pacientes con ES, en la proliferación fibroblástica, mediante el empleo de bloqueadores específicos de la trombina (hirudina, PPACK y ATIII).
4. Investigar el efecto inducido por la trombina pura en el metabolismo de la colágena de fibroblastos, mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Corroborar el efecto inducido por la trombina empleando en el mismo sistema el inhibidor específico de la trombina: hirudina.
5. Determinar el efecto de la α -trombina pura sobre la expresión del gen de la procolágena tipo I de fibroblastos de pulmón humano.

CAPITULO 4

MODULACION DE LA RESPUESTA FIBROBLASTICA INDUCIDA POR TGF β _{1,2,3}

El TGF β ₁ es un factor de crecimiento, conocido como potente estimulador de la síntesis de colágena (Roberts, 1986, Varga, 1986) y que ha sido implicado en la patogenésis de la fibrosis pulmonar (Broekelman, 1991). Sin embargo, se sabe que al menos existen cinco diferentes formas estructurales de dicho factor y aunque los TGF β ₂ y TGF β ₃ se han identificado en pulmón humano, se desconoce su papel en la patogenésis de la fibrosis pulmonar (McAnulty, 1995). Por otro lado, existen reportes controversiales acerca del efecto del TGF β ₁ como modulador de la actividad fibroblástica. Ya que se ha propuesto que este factor es capaz de inducir una estimulación y una inhibición en la proliferación (Battergay, 1990, Moses, 1990) y quimiotáxis (Postlethwaite, 1987, Osorio-Vargas, 1993) de fibroblastos pulmonares, dependiendo de las dosis de trabajo. Por lo que es motivo de este trabajo, dilucidar el efecto diferencial de cada una de las tres formas estructurales del TGF β (1-3) en la proliferación, quimiotáxis y el metabolismo de la colágena de fibroblastos de pulmón humano, normal y de pacientes con fibrosis pulmonar.

HIPOTESIS GENERAL. Si el TGF β ₁ es capaz de estimular *in vitro* la proliferación, quimiotáxis y la síntesis de la colágena de fibroblastos dependiendo de la concentración empleada, se espera que las formas estructurales relacionadas, TGF β ₂ y TGF β ₃, induzcan efectos biológicos semejantes a los reportados para TGF β ₁.

HIPOTESIS ESPECIFICAS

- Si el TGF β ₁ activa a fibroblastos de pulmón humano induciendo una excesiva producción de colágena, las formas estructurales relacionadas del factor de crecimiento transformante beta el TGF β ₂ y el TGF β ₃, serán también capaces de inducir la síntesis de colágena.

- Si el TGF β ₁ induce la proliferación celular de fibroblastos de prepucio humano, en forma dosis dependiente, éste y el TGF β ₂ y el TGF β ₃, podrán inducir proliferación en fibroblastos de pulmón humano en la misma forma.

- Si el TGF β_1 , no es quimiotáctico para fibroblastos de pulmón de rata, tampoco lo será para fibroblastos de pulmón humano. Se espera una respuesta semejante para el TGF β_2 y el TGF β_3 .

- Las diferentes formas estructurales del TGF β responderán de forma diferente en fibroblastos de pulmón humano normal y fibroblastos pulmonares de pacientes con fibrosis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el efecto inducido por tres de las diferentes formas estructurales del factor de crecimiento beta (TGF $\beta_{1,2,3}$) en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano normal y de pacientes con fibrosis pulmonar.

2. Determinar la posible quimioatracción inducida, por cada una de las formas estructurales del TGF β , en fibroblastos de pulmón humano normal y de pacientes con fibrosis pulmonar.

3. Investigar el efecto inducido por cada una de las formas estructurales del TGF β en el metabolismo de la colágena de fibroblastos de pulmón humano en cultivo.

4. Comparar y correlacionar los diferentes efectos biológicos evaluados e inducidos por cada una de las formas estructurales del TGF β .

CAPITULO 5

EXPRESION Y SECRECION DE PDGF EN MA ESTIMULADOS POR PARTICULAS INORGANICAS Y LA RESPUESTA QUIMIOTACTICA DIFERENCIAL DE FIBROBLASTOS A LOS DIMEROS DEL PDGF.

El PDGF es un potente mitógeno y quimioatrayente de fibroblastos pulmonares, por lo que se ha ligado a procesos fibróticos (Senior, 1983, Seppa, 1982). Aunque los péptidos del PDGF están muy relacionados, inducen un efecto biológico diferente en monocitos, células de músculo liso, neutrófilos y fibroblastos de piel (Martinet, 1987, Seppa, 1982, Heldin, 1985, Clark, 1989, Heldin 1993). Estas diferencias se han atribuido en parte, al distinto número de receptores para cada dímero del PDGF presente en los distintos tipos celulares (Bonner, 1993), sin embargo, también podría deberse a una expresión diferencial de estos dímeros, lo

que podría constituir un mecanismo de modulación de la actividad de este factor de crecimiento. Ejemplos de modulación semejante a la que se sugiere, se han demostrado en fibroblastos de pulmón de rata estimulados con asbesto (Lasky, 1995)

HIPOTESIS. Si cada uno de los dímeros del PDGF inducen una respuesta biológica diferente, se esperaría que cada uno de estos induzca una respuesta quimiotáctica diferente en fibroblastos de pulmón.

Si la actividad biológica inducida por cada dímero del PDGF es diferente, se esperaría que la expresión de las cadenas polipeptídicas A y B del PDGF ocurra en forma diferente.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar si las diferentes formas estructurales del PDGF (-AA, -AB, y -BB), inducen actividad biológica distinta a nivel de quimiotaxis.
2. Identificar y cuantificar la expresión de los genes que codifican para las cadenas polipeptídicas A y B del PDGF.
3. Seguir la expresión de los genes del PDGF a través del tiempo.
4. Correlacionar la expresión génica del PDGF con la aparición de productos en el medio.

CAPITULO 3

**MODULACION DE LA RESPUESTA BIOLOGICA INDUCIDA EN
FIBROBLASTOS DE PULMON HUMANO POR TROMBINA.**

I. MATERIAL Y METODO

PACIENTES

Las muestras de lavado broncoalveolar (LBA) fueron referidas por los doctores Carol Black y Ronald duBois del "Royal Free Hospital" y del "Royal Brompton Hospital" de Londres en Inglaterra. Se trabajó con 10 muestras de LBA de pacientes que llenaron los requisitos de la Asociación de Reumatología para el diagnóstico de esclerosis sistémica (Medsgær, 1986), y 10 para el diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática (Selman, 1986) y 10 de sarcoidosis (Scadding, 1985). Así mismo, se trabajó con 12 muestras de LBA de voluntarios sanos que fueron usadas como control.

Algunas de las características clínicas relevantes de los pacientes con ES son: que presentaron una edad promedio de 45 años, 9 de ellos fueron del sexo femenino, la duración promedio de su enfermedad fué de 4 años, sólo 2 de ellos poseían hábito tabáquico y de los LBA se recuperó un número promedio de 1.5×10^8 células/ml. Los pacientes con FPI presentaron una edad promedio de 60 años, 9 de ellos fueron del sexo masculino y poseían una duración de la enfermedad promedio de 6 años; sólo 1 no tenía hábito tabáquico y el número de células recuperadas de sus LBA fué de 1.3×10^8 /ml. Los pacientes con sarcoidosis con edad promedio de 41 años, fueron 50% mujeres y 50% hombres, con una duración promedio del padecimiento de 4 años, 9 de ellos fumadores y con un número de 0.97×10^8 células/ml en LBA. Los voluntarios sanos con edad promedio de 25 años fueron en un 50% mujeres. El número promedio de células recuperadas fué de 1.2×10^8 /ml, el 88% de éstas fueron macrófagos. No se observó diferencia significativa entre el control y los demás grupos.

LAVADO BRONCOALVEOLAR

Los lavados broncoalveolares se desarrollaron usando un broncoscopio de fibra óptica (Olympus), de acuerdo con el método descrito por Haslam (1980). Se administró a los pacientes atropina (4%) y como anestésico local lidocaina al 2%. La punta del broncoscopio se ajustó en el subsegmento lateral del lóbulo inferior derecho y 4 alícuotas de 60 ml de solución salina (pH=7.0) con 8.4% de bicarbonato, previamente precalentado se introdujeron y posteriormente se aspiraron suavemente. Los fluidos aspirados se colectaron en tubos estériles y se transportaron de inmediato, a la Unidad de Enfermedades Pulmonares del "National Heart and Lung Institute" para su procesamiento. Este procedimiento fué aprobado por el comité de ética del "Royal Brompton Hospital" y también fué efectuado en 12 voluntarios sanos, no fumadores, que accedieron a la prueba y cuyas muestras se emplearon como control.

CUENTA CELULAR

Los LBA se centrifugaron a 300 x g a 4°C por 5 minutos. El botón celular se lavó 3 veces con medio mínimo esencial amortiguado con Hepes (25mM, Gibco Bio-cult, Escocia), y posteriormente se realizó la cuenta total de las células recuperadas del LBA, usando una cámara de Neubauer y violeta de metilo al 1%, preparado en ácido acético al 1% como colorante vital. Las preparaciones celulares para realizar la cuenta diferencial, se hicieron mediante el empleo de una citocentrífuga (Shandon) con alícuotas de 100 µl de la suspensión celular ($\approx 1.25 \times 10^6$ células/ml) y centrifugando a 300 X g por 10 minutos. Las preparaciones una vez citocentrífugadas, se fijaron con metanol y se tiñeron con el colorante de May Grunwald. Este procedimiento fué realizado por los doctores A. Southcott y P. Pantelides en la Unidad de Enfermedad Pulmonar Intersticial del "National Heart and Lung Institute", quienes amablemente proporcionaron la información correspondiente.

PROCESAMIENTO DE LOS LBA

A fin de prevenir cualquier degradación proteica, las muestras de los LBA se manipularon siempre a 4°C. Se tomaron 5 ml del sobrenadante del LBA para realizar la determinación de proteínas totales y albúmina presentes en estas muestras. Posteriormente éstas se almacenaron en alícuotas de 10 ml a -40°C en tubos de polipropileno (Falcon, R & L Slaughter, Uppminster, Essex).

I) CONCENTRACION DE LOS LBA POR ULTRAFILTRACION

Debido a que la concentración de proteínas presente en el fluido epitelial se diluyó al momento de la toma de la muestra, primeramente se procedió a su concentración. Las alícuotas de 10 ml se descongelaron a 4°C y se concentraron 10 veces (10x), empleando una cámara de ultrafiltración estéril (Amicon, Stonhouse, Gloucestershire, U.K.). Para llevar a cabo este procedimiento, se empleó una membrana de ultrafiltración para retención de proteínas ≥ 1000 daltones (Amicon), aplicando una presión máxima de 5 Kg/cm² de nitrógeno. Finalmente el LBA se centrifugó a 9000 x g durante 3 minutos a 4°C; el sobrenadante se separó en alícuotas (50 µl) y se almacenó a -70°C hasta iniciar los experimentos.

II) DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES EN LBA

A fin de cuantificar la concentración de proteínas totales presentes en los LBA se empleó un sistema de pruebas disponible en forma comercial (BioRad, Hemel Hempstead, Herts, U.K.), que se basa en el uso del colorante azul brillante de Coomassie G-250 (CB G-

250, Bradford, 1976). Este colorante reacciona con las proteínas formando una complejo estable que tiene una absorbancia máxima a 595 nm. Una solución estándar de albúmina sérica humana (1.4 mg/ml, Sigma Chemical Co. Ltd.), fué empleada para realizar una curva estándar, en la que se probó un amplio intervalo de concentraciones que comprendían las usualmente presentes en los LBA: 0.2 - 140 mg/ml (Cambrey, 1992). El colorante diluido 5 veces se agregó a la muestras o estándares y se incubó a temperatura ambiente (10 min.), tiempo después del cual se cuantificó la absorbancia de cada muestra a 595 nm en un espectrofotómetro (Gilford 2600, Gilford Instrument Laboratories Inc., Oberlin, Ohio, USA.).

iii) DETERMINACION DE ALBUMINA EN LBA

La cuantificación de la concentración de albúmina presente en las muestras de LBA se realizó usando un sistema comercial (Sigma Chemical Co. Ltd., Poole, Dorset). La determinación se fundamenta en el empleo del colorante verde de bromocresol que se une a la albúmina específicamente y forma un complejo muy estable, mismo que presenta una absorbancia máxima a 628 nm (Doumas, 1971). Una solución de albúmina sérica humana, (Sigma Chemical Co. Ltd.), se empleó para realizar una curva estándar en un amplio intervalo de dosis (0.05 - 0.5 g/dl). Alícuotas de 1ml de las diferentes diluciones del estándar o bien, de la muestra sin concentrar, se adicionaron con 1ml de verde de bromocresol. Se incubó a temperatura ambiente y su absorbancia se determinó espectrofotométricamente a 628 nm (espectrofotómetro Gilford 2600, Corning Ltd, Essex).

iv) CUANTIFICACION DE TROMBINA EN LBA

La determinación de la concentración de la trombina presente en las muestras de LBA se efectuó mediante el empleo de un sustrato cromogénico específico para esta proteasa de serina (Idell, 1989), denominado S-2238 (H-D-Phe-Pro-Arg-p-nitro-anilina, Chromogeneix, Sweeden). Se mezclaron 40 µl del sustrato (4mM) con 40 µl de las diferentes muestras de LBA concentradas (10x) y 160 µl de solución amortiguada de fosfatos. Después de incubar dos minutos a 37°C, se determinó la absorbancia a 405 nm. La concentración de trombina se calculó a partir de curvas estándar preparadas por duplicado usando α-trombina humana (Sigma Chemical UK) en un amplio intervalo de concentraciones (1.1×10^{-10} M a 3.5×10^{-9} M).

CULTIVO CELULAR

Se emplearán fibroblastos de pulmón humano fetal: IMR 90 y HLF-1 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA). Las células se cultivaron en cajas de 10 cm de

diámetro (Nunc, Kamstrup, Dinamarca) y se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco modificado de Eagle (DMEM, Chester Beatty Laboratories, Londres, U.K.) suplementado con suero de ternera recién nacida al 10% (NCS) (Imperial Laboratories, Andover Hampshire, U.K), atmósfera húmeda al 10% de CO₂ y 37°C. En todos los experimentos realizados, ambas líneas celulares se usaron entre los pasajes 15 a 20. Una vez por mes, se verificó que los cultivos celulares estuvieran libres de micoplasma, empleando hibridación con una sonda de RNA ribosomal marcada radioactivamente (GeneProbe, Impex, Ltd. Teddington, Middlesex, U.K.).

ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR

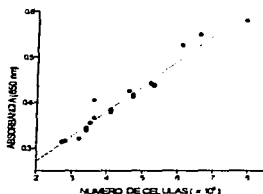
Para determinar el efecto de la trombina pura o presente en los LBA en la proliferación de los fibroblastos de pulmón, se trabajó con un método colorimétrico basado en el empleo del colorante azul de metileno (Sigma Chemical Co, U.K.), rápido y conveniente para contar células cultivadas en placas de 96 pozos (Oliver, 1989).

Se trabajó con cultivos confluentes de fibroblastos de pulmón humano (IMR90), mismos que se sembraron (6 x 10³ fibroblastos/por pozo) en DMEM suplementado con NCS al 0.8%. Después de 24 h de preincubación, para asegurar adherencia y su estado en fase G₀, se inició el experimento adicionando a los cultivos 100 µl de las diferentes diluciones de la trombina pura (0.15 x 10⁻¹¹ M - 1 x 10⁻¹⁰ M) (Sigma Chemical Co. Poole Dorset, U.K.), de los inhibidores específicos de la trombina puros: hirudin (0.7 x 10⁻⁹ M a 24 x 10⁻⁹ M) (Sigma Chemical Co., UK) (Fenton, 1991, Priestle, 1993, Grotter, 1990), PPACK (0.5 x 10⁻¹¹ M a 5 x 10⁻¹⁰ M), (Clabiochem, Novabiochem Ltd., Nottingham, U.K.) (Bode, 1989, Kettner, 1979) y ATIII (1.5 x 10⁻¹² M a 3 x 10⁻⁹ M) (Sigma Chemical Co., U.K.) (Jordana, 1980, Richards, 1993, Fenton, 1993), de las diferentes diluciones de los LBA: 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128 (previamente concentrados, 10x), o bien, mezclas de éstos, preparadas en medio DMEM suplementado con antibióticos y 0.4% de NCS. En cada experimento realizado se probaron en paralelo 6 replicas de cada muestra, dilución de trombina o mezcla. Fibroblastos expuestos a DMEM suplementado con NCS al 0.4% ó al 10% se usaron como blanco y control positivo respectivamente.

Para determinar la contribución específica de la trombina a la inducción de la proliferación de los fibroblastos IMR 90, se realizó el ensayo de proliferación antes mencionado, preincubando diluciones óptimas de las diferentes muestras de LBA (1/64), con concentraciones óptimas de inhibición de cada uno de los inhibidores de trombina hirudin (6 x 10⁻⁹ M) y PPACK (5 x 10⁻¹² M).

Una vez concluido el experimento, el medio de cultivo se eliminó y posteriormente se realizó un lavado sumergiendo la placa en ángulo de 60° en solución amortiguada de fosfatos. Una vez eliminada la solución amortiguada de fosfatos, las células se fijaron con 100 μ l de solución de formol-salina al 10% durante 30 minutos. Después de este tiempo, las células se tificaron con 100 μ l de azul de metileno (0.5 mM, Sigma Chemical Co. Ltd. Poole, U.K.) preparado en solución amortiguadora de boratos (pH = 8.5). Posteriormente se eliminó el colorante, se enjuagó el exceso de éste sumergiendo la placa en solución amortiguadora de boratos (0.01 M) y el colorante unido a las células se eluyó con 100 μ l de alcohol ácido (etanol - HCl 0.1 M, 1:1). Finalmente se determinó la absorbancia de los cultivos a 650 nm, empleando un espectrofotómetro para placas de 96 pozos (Titertek Multiscan MC, ICN Flow Laboratories Ltd., Irvine, U.K.). Los resultados se expresaron como el porcentaje de estimulación observado sobre las células control (expuestas solamente a DMEM suplementado con 0.4% de NCS).

h) VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR



A fin de validar el ensayo de proliferación celular, en al menos 3 placas de cultivo de 96 pozos de cada experimento (seleccionadas al azar), se contó bajo el microscopio (con la ayuda de una lente con cuadrícula) el número de células/pozo. Este resultado se correlacionó con las absorbancias cuantificadas previamente. A continuación se muestra uno de los ejemplos de validación. Las correlaciones obtenidas presentaron coeficientes de correlación entre 0.97 y 0.99, $p < 0.05$.

IDENTIFICACIÓN DE OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO PRESENTES EN LBA

Con el fin de identificar la presencia de otros factores de crecimiento, potencialmente presentes en las muestras de LBA, y que pudieran ser responsables del incremento en la proliferación de los fibroblastos, se desarrolló el método del azul de metileno antes descrito, incubando en presencia de anticuerpos bloqueadores de la actividad de PDGF (50 μ g/ml), (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), IGF-1 (1/4000), (Calbiochem, CO, San Diego CA, USA), y TGF- β (100 μ g/ml), (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A manera de control positivo, en paralelo se determinó el efecto de cada factor de crecimiento puro y en presencia de su anticuerpo.

METABOLISMO DE COLAGENA

Debido a que los fibroblastos de pulmón humano normal IMR-90, producen una cantidad muy pequeña de colágena (experiencia previa del laboratorio del Dr. Laurent), se emplearon fibroblastos fetales de pulmón humano normal HFL-1. El mantenimiento de las líneas celulares se realizó en las condiciones descritas previamente.

)) ESTIMACION DE LA PRODUCCION DE PROCOLAGENA

La determinación de la síntesis de procolágena, se realizó mediante la cuantificación de hidroxiprolina en proteínas secretadas por cultivos de células HFL-1. Para este fin, se empleó la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC). La estandarización de dicho método se desarrolló en el laboratorio del Dr. Laurent (Campa, 1990 y McAnulty, 1991). Brevemente, 1 x 10⁵ fibroblastos HFL-1 por ml, crecidos en DMEM al 5% de NCS (ICN Flow, High Wycombe, U.K.), se sembraron en placas de cultivo de 12 pozos (1 ml/pozo). Los fibroblastos se incubaron a 37°C, en una atmósfera húmeda y al 10% de CO₂ hasta la confluencia total (aproximadamente 5 días). Posteriormente, las células se incubaron por 24 h más, tiempo después del cual, el medio se eliminó y se reemplazó por 1 ml de medio de preincubación (DMEM suplementado con glutamina 4 mM, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 0.2 mM de prolina y 1% de NCS) incubándose 24 h más. Posteriormente se reemplazó el medio de cultivo por medio de preincubación recién preparado sólo (control), adicionado con TGFβ₁ (British Biotechnology, Oxford, U.K., 1 ng/ml) empleado como control positivo, o bien, con la sustancia de prueba (trombina, trombina + hirudina, LBA, LBA + hirudina, etc.). La producción de procolágena se determinó 24 h después (tiempo durante el cual la cinética de la reacción sigue una tendencia lineal (Campa, 1990). Al fin del experimento, la monocapa celular se levantó mediante el uso de un gendarme de teflón. Cada pozo se lavó con 1 ml de solución amortiguada de fosfatos y se mezcló con el sobrenadante original. Debido a que una pequeña cantidad de procolágena permanece latente en la monocapa celular y además existe hidroxiprolina presente en el suero, éstas se cuantificaron estimando los valores de hidroxiprolina al tiempo cero "t=0". Estos valores se sustrajeron del valor de las muestras, logrando estimar la cantidad de hidroxiprolina real generada durante el período de incubación.

Las proteínas presentes en el medio de cultivo, se precipitaron con etanol en una concentración final del 67%, durante 12h a 4°C. Después de este tiempo, las proteínas se separaron de los amino ácidos libres mediante filtración al vacío empleando una unidad de filtración Millipore (filtros tipo HV con poros de 0.45 µm, Millipore, Watford, U.K.). Los filtros se

lavarón con etanol al 67%, y los sobrenadantes se evaporaron hasta sequedad total (Dri-Block Sample Concentrator, Techne DB-3, SC-3), el mismo procedimiento se siguió en las proteínas adheridas al filtro. Posteriormente, todas las muestras se hidrolizaron en 2 ml de HCl 6 M, a 110°C durante 16 h. Los hidrolizados se decoloraron con 30 mg de carbón activado (BDH Chemicals Ltd., U.K.) y se filtraron a través de filtros con poros de 65 µm de diámetro (tipo DA, Millipore Ltd. U.K.) a tubos de poliestireno (Sarstedt Ltd., Beaumont Leys, U.K.), donde se almacenaron hasta antes de realizar el análisis cromatográfico.

ii) OBTENCION DE AMINO ACIDOS CONJUGADOS AL CROMOGENO.

Alicuotas de 100 µl del hidrolizado, se evaporaron al vacío y a 45°C hasta sequedad, empleando un Speed Vac (Millipore Ltd. U.K.). Los residuos se resuspendieron en 100 µl de agua y se amortiguaron con 100 µl de solución de tetraborato de potasio (0,4 M, pH = 9,5), y 100 µl de 7-cloruro de 4 nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl, 12 mM), preparado en metanol. La conjugación se realizó durante 20 minutos de incubación a 37°C en la oscuridad. Bajo estas condiciones la hidroxiprolina reacciona con el NBD-Cl produciendo un cromógeno que absorbe a 495 nm, (Figura 3).

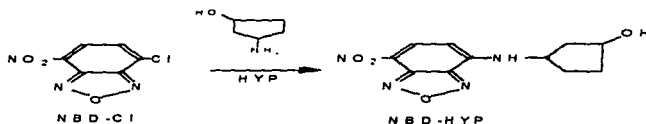


Figura 3. Reacción del NBD-Cl con la hidroxiprolina (HYP)

La reacción se detuvo, con la adición de 50 µl de ácido clorhídrico 1.5 M y 150 µl de acetato de sodio 167 mM (Fisons, Loughborough, U.K.), preparados en acetonitrilo al 26%. Después de esto, las muestras se filtraron a través de filtros con poros de 0.22 µm de diámetro (tipo GV de Millipore). Una alícuota de 100 µl de las muestras conjugadas se inyectó entonces, en la columna del HPLC.

iii) INSTRUMENTACION Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS (HPLC)

Las muestras conjugadas se separaron usando un sistema de gradiente de una sola boma (Pharmacia/LKB, Milton Keynes), acoplado a una columna de fase reversa

(LiChroCARTLiChrospher, 250 mm de largo x 4 mm de diámetro, y 5 μ m de tamaño de partícula, 100 RP-18, Merck/BDH, Poole, Dorset, U.K.), protegida por una pre-columna (LiChrosorb, 4 x 4 mm, 5 μ m, 100 RP-18). Las muestras fueron eluidas con un gradiente de acetonitrilo, como se describió por Campa y cols. en 1990, y la detección post-columna se realizó monitoreando la absorbancia a 495 nm. Para llevar a cabo el análisis cuantitativo, la señal se procesó en una integrador computarizado de cromatografía Trio (Trivector, Sandy). En este sistema, la hidroxiprolina pura (Sigma Chemical CO, Ltd., Poole Dorset, U.K.) eluye con un pico aproximadamente a los 5 1/2 minutos después de la inyección.

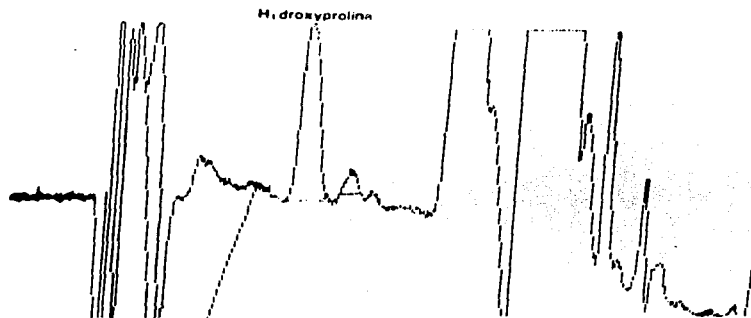


Figura 4. Cromatograma de la hidroxiprolina por HPLC

El contenido de hidroxiprolina presente en cada muestra, se determinó por comparación de las áreas de los picos eluidos en los cromatogramas, con los picos de la solución estándar que fueron conjugadas y separadas en las mismas condiciones. Estas se probaron al principio y al final de cada periodo experimental. A los resultados obtenidos se sustrajo el valor de T_0 (concentración de hidroxiprolina presente en el medio de cultivo), para obtener el valor real de hidroxiprolina en cada pozo.

(v) INDICES DE SINTESIS Y DEGRADACION DE PROCOLAGENA.

La hidroxiprolina cuantificada en la fracción insoluble en etanol, se consideró como proveniente de la procolágena secretada en el medio de cultivo. La velocidad a la cual esto

ocurre provee un índice de la producción de la procolágena (Campa y cols., 1990) y se expresa como pmol de hidroxiprolina/ μg de DNA/h. La hidroxiprolina presente en la fracción soluble a etanol (hidroxiprolina libre) representa entonces, la hidroxiprolina derivada de la procolágena sintetizada y subsecuentemente degradada durante el período de cultivo. El índice de procolágena sintetizada se obtuvo de la combinación de valores de las fracciones solubles e insolubles en etanol. La proporción de procolágena degradada se expresó como el porcentaje del total de procolágena sintetizada.

v) ESTIMACION DEL CONTENIDO DE DNA EN CULTIVO

Cultivos de fibroblastos idénticos a los descritos anteriormente, se emplearon para determinar el contenido de DNA por pozo como un indicador del número celular. La estimación de DNA se fundamenta en un método previamente descrito, (Briton, 1956) al que se hicieron algunas modificaciones, que permitieron la medición de pequeñas cantidades de DNA (McAnulty y cols., 1991).

Al término del período de incubación, las células se resuspendieron en solución amortiguada de fosfatos mediante el empleo de un gendarme de teflón. El "pellet" resuspendido se centrifugó (12 000 rpm a 4°C durante 20 min.) y el "pellet" obtenido se resuspendió nuevamente en 1 ml de solución amortiguada de fosfatos, mismo que se almacenó a - 40°C hasta la realización del ensayo.

v) ENSAYO DE DNA.

Los "pellets" celulares fueron descongelados, centrifugados (12 000 rpm a 4°C, 20 min.), y resuspendidos en 1 ml de ácido perclórico 0.5 M, solución en la que se incubaron durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (12 000 rpm a 4°C durante 20 min.). Este paso se repitió 2 veces más y finalmente los "pellets" se resuspendieron en 1.2 ml de ácido perclórico (0.8 M) y se calentaron durante 45 minutos a 70°C. Transcurrido este tiempo de incubación, las muestras se enfriaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron (12 000 rpm a 4°C por 3 min.) rescatando los sobrenadantes. Una alícuota de 1 ml se tomó para realizar el ensayo.

Una curva estándar de DNA de timo de ternera (Sigma Chemical Co. Ltd.), (0 a 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$), se preparó en 1 ml de ácido perclórico 0.8 M ($r=0.98$), y a partir de ésta se calculó la concentración de DNA/pozo/hora. Los estándares se procesaron al mismo tiempo que las

muestras. Al ml de muestra o estándar se les adicionaron entonces 100 μ l de una solución acuosa de acetaldehído (1.6 mg/ml) y 1 ml de difenilamina (4%) preparada en ácido acético glacial. Después de mezclar vigorosamente, las muestras se incubaron durante 12 h a 30°C. Transcurrido este período de incubación, se determinó la absorbancia de las muestras y estándares a 595 nm (espectrofotómetro Gilford 2600). La relación lineal entre la concentración de DNA de las soluciones estándar y la absorbancia de las mismas a 595 nm permitió trazar una curva patrón, en la cual se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras, y se determinó la concentración de DNA/pozo de las diferentes muestras problema.

Las cantidades de DNA cuantificadas en los cultivos control, no fueron significativamente diferentes para los cultivos incubadas con trombina o con TGF β , por lo que el contenido de DNA por pozo se consideró como 5.86 ± 0.3 μ g/pozo. Una vez descrito el efecto inducido por trombina en el metabolismo de colágena, se intentó determinar si tal efecto era atribuible exclusivamente a trombina, empleando al inhibidor específico de la trombina: hirudina. En este nuevo experimento los valores de DNA en los cultivos control y los cultivos incubados en presencia de trombina, trombina + hirudina y TGF β , tampoco fueron diferentes. Se consideró el valor promedio de DNA encontrado: 6.29 ± 0.5 μ g/pozo.

El efecto de la α -trombina en la síntesis de procolágena de los cultivos de fibroblastos HLF-1, se realizó siguiendo la metodología antes descrita y empleando diferentes concentraciones de α -trombina (Sigma Chemical Co.), (10^{-2} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M y 10^{-12} M) sola o en presencia de su inhibidor hirudina (Sigma Chemical Co., 6×10^{-9} M). Siempre se trabajó con TGF β , (1 ng/ml, British Biotechnology) como control positivo de inducción de síntesis de procolágena. En el caso de las muestras de LBA probadas se adicionaron diluciones 1:4 de las mismas.

SEPARACION DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LBA (SDS-PAGE)

A fin de identificar los PM de las proteínas presentes en las diferentes muestras de los LBA, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida de acuerdo al método de Laemmli (1970). Los geles se prepararon empleando concentraciones de 9% y 12.5% de acrilamida (Integra Biosciences, Northumbria, U.K.). El gel de inicio siempre se preparó con acrilamida al 3% y se trabajó con corriente de 25 mA para permitir el paso de las muestras por éste, posteriormente, la corriente se incrementó a 55 mA. La corrida del gel se terminó cuando el marcador de corrida (azul de bromofenol), alcanzó 20 mm antes del final del gel. El

calentamiento del gel durante la corrida, se previno recirculando agua fría en la cámara de electroforesis.

i) PREPARACION DE MUESTRAS PARA SDS-PAGE.

100 μ l de las diferentes muestras de LBA concentrado (10x), se mezclaron con 100 μ l de colorante de corrida para electroforesis (SDS al 3.1%, azul de bromofenol al 0.01%, solución amortiguadora de tris, 0.06 mM a pH=6.8). Posteriormente se tomaron 25 μ l de esta solución y se mezclaron en una proporción 1:1 con 25 μ l de solución amortiguadora adicionada con glicerol al 20% y de azul de bromofenol al 0.3%. A fin de observar la separación de las proteínas presentes en algunas de las muestras de LBA en condiciones reducidas, se adicionó β -mercaptoetanol a ambas soluciones de mezcla. El peso molecular aparente de las bandas de proteínas, presentes en las muestras de LBA, se determinó, empleando simultáneamente un marcador arcoiris, con intervalos de peso molecular de 14 a 200 KDa (Amersham International PLC, Aylesbury, Bucks, U.K.). Las bandas de proteínas separadas por electroforesis en los geles de poliacrilamida, se visualizaron empleando el método de tinción de plata, aproximadamente 100 veces más sensible que la tinción con azul de coomassie R250.

ii) TINCION DE PLATA.

El método fue originalmente descrito por Merril & Shifin (1979). En la realización del presente trabajo se empleó un sistema para tinción comercial (Biol Rad, Hemel Hempstead, Herts, U.K.). Brevemente, la fijación de proteínas al gel se realizó en metanol - ácido acético 50% - 20%, preparado en agua. Posteriormente los geles se lavaron con agua desionizada. Los geles se tiñeron por 15 minutos en solución de AgNO_3 0.8%, NaOH 0.07% e hidróxido de amonio 0.16 M y se revelaron con 5×10^{-3} M ácido cítrico y 0.019% de formaldehído. Transcurrido el tiempo de tinción, la reacción se detuvo con metanol al 50%.

INMUNOELECTRO-TRANSFERENCIA

Para identificar la presencia de la trombina en los LBA, se separaron las proteínas de las diferentes muestras de LBA de los pacientes con ES, en condiciones normales y de reducción, empleando el método antes descrito. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nylon-nitrocelulosa. La identificación de trombina se realizó mediante métodos de inmunodetección y con la ayuda de un método de quimioluminiscencia. La electrotransferencia se realizó empleando una membrana de nylon-nitrocelulosa (Hybond-C

Super, Amersham, Aylesbury, U.K.), en solución amortiguadora de comida (glicina 39 mM, tris 48 mM, SDS 0.0375% y metanol 20%) durante 12 h con una corriente de 0.5 mA. La eficiencia de dicha transferencia se comprobó mediante la tinción de las proteínas inmovilizadas en la membrana con una solución de negro de amido al 5% preparado en metanol - ácido acético en proporción 25% - 10%, preparada en agua. Una vez verificada la transferencia, las membranas se destiñeron inmediatamente con metanol - ácido acético (45% - 10%).

i) INMUNODETECCION DETROMBINA EN LBA

La inmunodetección es un método diseñado para la detección específica de bandas de proteínas inmovilizadas en una membrana de nylon-nitrocelulosa. Los sitios de unión inespecífica presentes en la membrana, se bloquearon incubándola (1-2 hrs) en solución amortiguadora de fosfatos (Oxid, Basingstock, Hampshire, U.K.) adicionada con leche semidescremada en polvo al 3% y tween 20 al 0.05%. Posteriormente, la membrana se incubó en presencia de un anticuerpo (IgG) policlonal, en concentración óptima, misma que fue previamente estandarizada (1:500). Este anticuerpo dirigido contra la trombina humana y obtenido en conejo, (America Diagnostica Inc., Greenwich, CT), se incubó durante 1 h con la membrana y después se lavó con solución amortiguada de fosfatos y tween 20 al 0.05%.

ii) DETECCION DE TROMBINA POR QUIMIOLUMINISCENCIA (ECL)

Complejos de antígeno-anticuerpo pueden ser identificados por quimioluminiscencia (Enhanced chemoluminescence - ECL). En este trabajo se empleó un sistema comercial (Amersham, Aylesbury, U.K.), que se fundamenta en el uso de una reacción luminosa no radioactiva, para detectar el complejo trombina-antitrombina. El sistema usa luminol de diacilhidracida cíclica, misma que se oxida en presencia del anticuerpo secundario obtenido en caballo y conjugado con peroxidasa, la que en presencia de peróxido de hidrógeno genera la emisión de luz. Las membranas previamente incubadas con los anticuerpos primario y secundario, se incubaron con luminol durante 1 minuto. Después de este tiempo la emisión de la señal de luz se detectó exponiendo la membrana a placas de rayos X (Hyper Film ECL, Amersham, Aylesbury, U.K.). Los tiempos de exposición fueron variables dependiendo de la intensidad de luz emitida, en general fluctuaron entre 15 segundos y 2 minutos. Las placas de rayos x se revelaron empleando un procesador de placas de rayos X automatizado (Fuji, Londres, U.K.).

ANÁLISIS DE NORTHERN BLOT PARA PROCOLÁGENA INDUCIDA POR TROMBINA

Cultivos de fibroblastos HLF-1 en condiciones idénticas a las descritas anteriormente para la valoración del metabolismo de colágena, se sembraron y se crecieron a confluencia y de éstos se obtuvo el RNA total de los fibroblastos incubados en presencia de α -trombina (10^{-8} M a 10^{-12} M) pura, y adicionada con hirudina (6×10^{-9} M). Medio de cultivo solo, o adicionado con TGF β_1 (1 ng/ml), se emplearon como blanco y control positivo respectivamente. La monocapa celular se lisó en presencia de isotiocianato de guanidina (Sigma Chemical Co. Poole, Dorset, U.K.) para la obtención del mRNA total, que fue extraído usando el método del cloruro de litio (Sigma Chemical Co. Poole, Dorset, U.K.) (Chomczynski, 1987).

30 μ g de RNA total de cada muestra, se sometieron a electroforesis, en geles de agarosa al 1.2%, con formaldehído 2.2 M y se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon-nitrocelulosa (Hybond C-Super, Amersham, Aylesbury, U.K.). Para confirmar la integridad y el tamaño de los RNA ribosomales 28s y 18s, se trabajó en forma simultánea con un marcador de peso molecular de RNA (RNA ladder de GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Se prehibridó durante 4 h a 42°C en solución amortiguada de fosfatos (50 mM), 6X SSC, 5X de solución de Denhardt, 0.1% SDS y 100 μ g de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado. Posteriormente la membrana se incubó durante 12h a 42°C con la sonda Hf 677 para procolágena $\alpha 2(1)$, que reconoce a la colágena tipo I y de la que se han descrito dos transcritos de 7.2 y 5.9pb respectivamente (Chu, 1982). Dicha sonda se marcó radioactivamente (5×10^8 cpm/ml de αP^{32} -DCTP) (Amersham, Life Sciences, Aylesbury, U.K.). Al final del periodo de hibridación la membrana se lavó 4 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente en SSC 2X - SDS 0.1%, y dos veces 15 minutos con SSC 0.1X - SDS 0.1%. Finalmente la membrana se expuso durante una semana a una placa de rayos X (Kodak X-OMAT, Londres, U.K.). Como control de la cantidad de RNA adicionado al gel, se hibridó la misma membrana con la sonda para la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (GADPH, ATCC, Rocville, MA, USA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos se expresaron en medianas e intervalos y se compararon mediante el uso de la prueba de U de Mann-Whitney. Además se empleó la prueba de "t" de Student de dos colas para determinar diferencias significativas, un valor de $p < 0.05$ se consideró como significativo, en ambos casos. En el caso de los datos paramétricos y no paramétricos valores de $r=0.6$ y 0.85 se consideraron como significativos respectivamente.

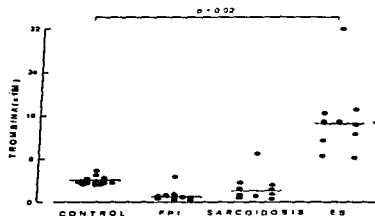
II. RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE TROMBINA EN MUESTRAS DE LBA.

1) CURVA ESTÁNDAR DE TROMBINA.

Los niveles de trombina presentes en las diferentes muestras de LBA concentradas (10x), se determinaron mediante el ensayo cromogénico, descrito en la sección de métodos. La concentración de trombina en las muestras, se calculó a partir de una curva estándar realizada con trombina pura en un intervalo de concentraciones de 0.11×10^{-9} M a 3.5×10^{-9} M. El coeficiente de correlación obtenido fué $r=0.99$.

II) NIVELES DE TROMBINA EN MUESTRAS DE LBA



Como se observa en la siguiente gráfica, la concentración de trombina se encuentra elevada en las muestras de los pacientes con ES. En todas las muestras se observó un valor superior, al valor más alto determinado en las muestras control. En los pacientes con ES, se observó una mediana de la concentración de trombina de 14.6×10^{-9} M (8.2×10^{-9} M a 32.2×10^{-9} M), mientras que para los pacientes con

FPI y sarcoidosis las medianas fueron de 0.85×10^{-9} M (0.42×10^{-9} M a 4.63×10^{-9} M) y 1.92×10^{-9} M (0.65×10^{-9} M a 9×10^{-9} M), respectivamente. Estas últimas no presentaron ninguna diferencia significativa con respecto a los niveles de trombina encontrados en los LBA de los voluntarios sanos: 4.1×10^{-9} M (3.3×10^{-9} M a 5.8×10^{-9} M). En cambio la mediana de la concentración de trombina de las muestras de los pacientes con ES, fué aproximadamente 3 veces mayor, comparando con la de los controles ($p < 0.02$).

PROLIFERACION CELULAR

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DEL CULTIVO

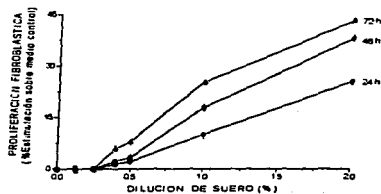
Debido a que la proliferación de fibroblastos es dependiente de la densidad celular sembrada y de la concentración de suero empleada, como primer punto para el desarrollo del presente trabajo, se estandarizó la concentración óptima de suero a emplear. El número celular y el volúmen óptimo por pozo fueron estandarizados previamente por la Dra. A.D.

Cambrey (6×10^3 células por pozo cultivadas en 100 μ l de DMEM en placas de cultivo de 96 pozos).

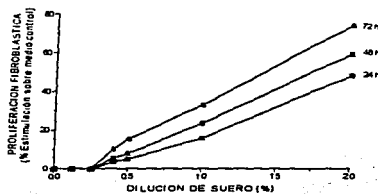
1) CURVA DOSIS RESPUESTA A NCS EN FIBROBLASTOS IMR-90

A fin de asegurar que la proliferación fibroblástica observada, en respuesta al factor o factores de crecimiento adicionados (trombina, LBA, etc), fuera independiente de la contribución que pudiera ejercer el suero presente en el medio de cultivo, los fibroblastos fueron cultivados en ausencia de suero. Sin embargo, esta línea celular no soportó estas condiciones de cultivo; por lo que se probaron diluciones seriadas del mismo (0.15% a 2%), para determinar la concentración de suero a emplear. En paralelo se estandarizó el tiempo óptimo de incubación del cultivo (24h, 48h y 72h) y la concentración de suero a la que preincubarían las células antes de iniciar el experimento, asegurando su adhesión a la placa de cultivo, sin estimular previamente los mecanismos de proliferación celular. Se ensayaron dos condiciones de preincubación: 24h en presencia de 0.4% y 2% de NCS.

Como puede observarse en las siguientes gráficas, el periodo de pre-incubación de 24 h a baja concentración de suero (0.4%), fue suficiente para asegurar que las células se adhieran adecuadamente, sin estimular la proliferación. Así mismo se encontró, que a esta baja concentración de suero obtuvo el crecimiento lento deseado y una absorbancia aceptable. Por lo que en experimentos posteriores se empleó un periodo de pre-incubación de 24 h con NCS al 0.4%. Los experimentos se desarrollaron también con esta concentración baja de NCS.



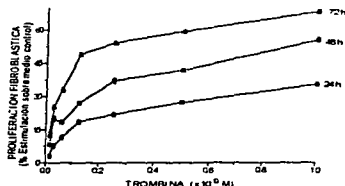
Pre-incubadas 24 h con NCS al 0.4%.



Pre-incubadas 24 h con NCS al 2%.

En paralelo se evaluó el efecto inducido por el control positivo (medio DMEM suplementado al 10% con NCS), se observaron valores de 136.9%, 159.4% y 189.2% de estimulación en la proliferación fibroblástica sobre el medio control a las 24, 48 y 72 horas respectivamente. En la curva dosis respuesta a suero en que las células fueron pre-incubadas 24 h con NCS al 2%, el control positivo (medio DMEM suplementado al 10% con NCS), indujo una estimulación de la proliferación fibroblástica de 309.5%, 350% y 259% sobre el medio control a las 24, 48 y 72 horas respectivamente (estos resultados no se muestran en la gráfica).

II) CURVA DOSIS RESPUESTA A TROMBINA EN EL TIEMPO.



En las condiciones antes descritas, se incubaron diferentes concentraciones de trombina (0.016×10^{10} M a 1×10^{10} M) durante 24, 48 y 72 horas y al 0.4% de NCS para definir el tiempo de efecto óptimo de esta proteasa de serina. La trombina presentó un máximo de estimulación de la proliferación fibroblástica a cualquiera de los tres períodos de tiempo probados (35.5% para 24 h, 55.6% para 48 h, y 68.4% para 72 h) a una concentración de 1×10^{10} M. Sin embargo, en la curva de 24 h se observaron valores de estimulación relativamente bajos, las curvas de 48

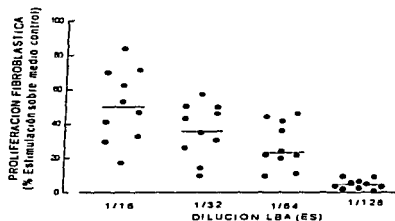
y 72 h son las que presentaron mejor porcentaje de estimulación. Debido a que a las 72 h podrían empezar a generarse otros factores de crecimiento que intervieran en el sistema y que enmascararían por tanto, el efecto del factor a probar (Baserga, 1985), se seleccionó el tiempo de 48 h, como tiempo óptimo de la determinación. El resto de los experimentos que se presentarán se desarrollaron en este período de tiempo.

DETERMINACION DE LA DILUCION OPTIMA DE LBA.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, los fibroblastos de pulmón humano IMR 90, se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos. Después de las 24 h de preincubación se cambió el medio de cultivo por medio nuevo, suplementado con NCS al 0.4% y diferentes diluciones de LBA (1/16, 1/32, 1/64, 1/128), preparadas en el mismo medio. Seis réplicas de cada dilución y de cada muestra se probaron en forma simultánea. En experimentos previos, se trabajó con diluciones de LBA del 1/2 a 1/8, sin embargo, éstas indujeron un aparente efecto

tóxico en las células, por lo que en experimentos subsecuentes ya no se trabajó más con estas altas concentraciones de muestra. La proliferación celular inducida por los lavados de voluntarios sanos (1/16) fué de 2.3% a 6.1% \pm 10.9% y esto no resultó ser significativamente diferente con respecto al control.

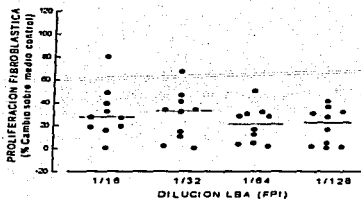
1) EFECTO DE LBA DE PACIENTES CON FIBROSIS EN PROLIFERACIÓN



Como se observa en la figura, todas las muestras de LBA de pacientes con ES, indujeron un aumento en la proliferación de los fibroblastos de pulmón humano IMR-90. Con la dilución 1/16, se observó el efecto óptimo con una mediana máxima de estimulación del 50%; (17% a 83.8%) sobre el medio control. Este valor representa aproximadamente 1/3 del obtenido en el sistema con el máximo

de estimulación posible (control positivo, medio suplementado con NCS al 10%). Conforme se diluyó la concentración del LBA, disminuyó la actividad de proliferación (dilución 1/32 y 1/64: 39%; 9.5% a 57% y 23%; 9.4% a 48% de estimulación sobre medio control respectivamente), hasta que a la dilución 1/128 (4.2%; 1.5% a 9.1%) no se observó diferencia significativa con respecto a la proliferación inducida por los LBA de los voluntarios sanos. Cabe mencionar el hecho de que para cada una de las muestras de LBA evaluadas, la proliferación fibroblástica disminuyó conforme se diluyó la muestra.

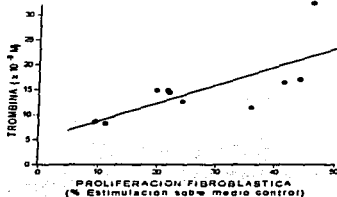
Las muestras de LBA de pacientes con FPI y sarcoidosis, también indujeron un incremento en la proliferación fibroblástica. En el caso de los pacientes con FPI, la estimulación de la proliferación fué independiente de la dilución del LBA probada. En estas muestras, la mediana de la proliferación inducida por la dilución 1/16 fué del 26.8%; (0.7% a 79.4%), mientras que las medianas de la proliferación inducidas por las diluciones 1/32, 1/64 y 1/128 fueron de 32.9%; (2% a 67%), 22.3%; (2.1% a 50%), y 22.2%; (0.7% a 41.3%) respectivamente. Todas las diluciones probadas indujeron una proliferación significativa comparadas con el medio control ($p < 0.05$).



Para las muestras de LBA de pacientes con sarcoidosis la dilución 1/16 indujo una mediana de la proliferación de 45.5%; (-18% a 72%), mientras que las diluciones 1/32, 1/64 y 1/128 indujeron valores de medianas de proliferación del 29%; (1.4% - 105.3%), 32.9%; (3.5% a 49.8%), y 14.61%; (0.2% a 31%) respectivamente.

II) CORRELACION ENTRE TROMBINA DE LBA (ES) Y PROLIFERACION

Considerando que se detectaron altas concentraciones de trombina en las muestras de LBA de pacientes con ES, y que dichas muestras indujeron la proliferación celular de los fibroblastos de pulmón humano normal (IMR-90), en forma dosis dependiente de la dilución de LBA empleada, se intento establecer una correlación entre los niveles de trombina presentes en las muestras de LBA de estos pacientes, y la proliferación fibroblástica inducida por éstos.



Como se muestra en la siguiente figura, existe una correlación significativa ($r=0.72$, $p<0.02$) entre la capacidad mitogénica de las muestras de LBA de pacientes con ES y los niveles de trombina presentes en éstas. Por otro lado, no se encontró correlación entre los bajos niveles de trombina encontrados en las muestras de LBA de pacientes con FPI y sarcoidosis y la proliferación celular inducida por estas muestras de LBA.

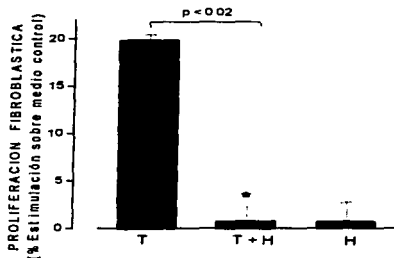
DETERMINACION DE LA CONTRIBUCION ESPECIFICA DE LA TROMBINA A LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS DE PULMON.

A fin de determinar la contribución específica de la trombina presente en las diferentes muestras de LBA, al incremento en la proliferación de los fibroblastos IMR 90, se trabajó con inhibidores específicos de la trombina: la hirudina (inhibidor altamente específico y selectivo, de la trombina, obtenido de la saliva de sanguijuelas) (Fenton, 1993, Prestle, 1993), el PPACK (inhibidor sintético de la trombina y dependiendo del tiempo de incubación, de algunas otras proteasas) (Kettner, 1979, Bode, 1989), y la ATIII (inhibidor natural de la trombina (Richards, 1993). Primeramente se estableció el efecto que cada uno de éstos tenía en la proliferación celular por sí mismo. Posteriormente, se estableció la dosis óptima de inhibición de cada uno de estos, con trombina pura en dosis de estimulación subóptima (2×10^{-11} M), y finalmente se intentó bloquear la proliferación inducida por las diferentes muestras de LBA, con los inhibidores de trombina empleando la dosis óptimas.

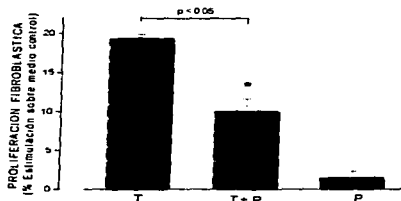
En experimentos previos se estandarizó que la dilución 1/64 era la concentración óptima de LBA a emplear, en presencia de los inhibidores de trombina, ya que la actividad de proliferación inducida por esta dilución podía ser bloqueada empleando la misma dosis de inhibidor que bloqueaba a la trombina pura en la dosis elegida (2×10^{-11} M). En todos los experimentos subsiguientes se trabajó con muestras de LBA en dilución 1/64.

J) EFECTO INDUCIDO POR HIRUDIN, PPACK Y AT-III EN PROLIFERACIÓN

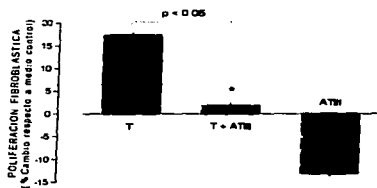
Se trabajó con un amplio intervalo de concentraciones de hirudina (1.25×10^{-11} M a 24×10^{-9}), en presencia de trombina. En todas ellas se observó una inhibición significativa del efecto inducido por la trombina en la proliferación fibroblástica (98% - 100%, $p < 0.02$). Sin embargo, en ausencia de trombina, estas dosis de hirudina (Sigma Chemical Co) indujeron una inhibición (1.34% al 8.68%) o una estimulación en la proliferación (8.54%), y no se consideraron. En cambio, la dosis de



6×10^{-9} M, de hirudina (H) (se muestra en la gráfica), no indujo ningún cambio significativo en la proliferación fibroblástica con respecto al medio control (0.69%), e indujo una inhibición significativa (*) del $96\% \pm 0.6\%$ sobre la proliferación fibroblástica inducida por la trombina (T) ($p < 0.02$). En el resto de los experimentos, se trabajó con esta dosis como la de inhibición óptima.



tuvieron diversos efectos en la proliferación. A dosis bajas el PPACK indujo inhibición, mientras que a dosis altas se observó una estimulación de la proliferación celular. La dosis seleccionada como óptima inhibió la proliferación fibroblástica inducida por trombina (T) significativamente (*) en un $50\% \pm 0.8\%$ con respecto al medio control ($p < 0.05$).



todas ellas mostraron toxicidad en el cultivo, al probarse en ausencia de trombina (62% al 99%). Una vez estandarizadas las condiciones y concentraciones óptimas de inhibición, se

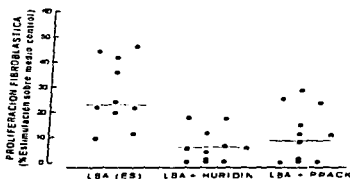
En el caso del inhibidor de trombina PPACK (P), se trabajó con la única dosis que no tuvo efecto significativo por sí misma en la proliferación fibroblástica comparada con el medio control (5×10^{-12} M) (observada en la gráfica). Las otras dosis empleadas (2×10^{-11} M a 5×10^{-10} M), aunque indujeron una inhibición en la proliferación celular inducida por la trombina (-14% a -23%), por sí mismas,

Pese a que la ATIII (3×10^{-9} M) indujo una inhibición significativa (*) de hasta del $89\% \pm 0.5\%$ (se muestra en la gráfica), sobre la proliferación fibroblástica inducida por la trombina (T) ($p < 0.05$), esta misma dosis, indujo una inhibición de la proliferación (-13.24%). Las demás dosis de ATIII probadas (0.15×10^{-11} M a 3×10^{-9} M), indujeron inhibición en la proliferación inducida por trombina (20% al 97%) pero

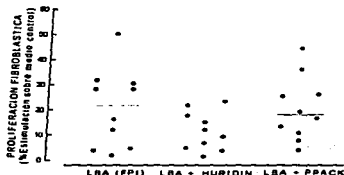
prosiguió a intentar inhibir la proliferación celular inducida por las diferentes muestras de LBA mediante el uso de Hirudina y PPACK. No se trabajó más con AT III debido a la toxicidad observada.

1) INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN FIBROBLÁSTICA INDUCIDA POR LBA (ES, FPI Y SARCOIDOSIS) CON HIRUDIN Y PPACK.

Como puede verse en la figura, los inhibidores específicos de trombina: hirudina y PPACK inhibieron la proliferación inducida por las muestras de LBA de pacientes con ES. La hirudina inhibió la proliferación de cada una de las muestras (19% al 99%), con un decremento significativo (*) promedio en la proliferación fibroblástica del $68\% \pm 9.8\%$ ($p < 0.05$). Por su parte el PPACK, también indujo reducción significativa (*) en la



proliferación de cada muestra (43% al 68%), con una disminución en la proliferación promedio del $51.2\% \pm 13.1\%$ ($p < 0.05$). En cada muestra de LBA la proliferación inducida por ésta fue disminuida por hirudina y PPACK. Ninguno de los inhibidores de la trombina disminuyeron en forma significativa la proliferación fibroblástica inducida por las muestras de LBA de los pacientes con FPI o sarcoidosis. En muestras de LBA de pacientes con FPI, la hirudina disminuyó la proliferación inducida por éstas (22.36%), en un 51% (0% a 66%). Con PPACK se encontró una mediana de inhibición de la proliferación inducida por los LBA de un 19.6% que tampoco resultó significativa. Hirudina indujo una inhibición media del 33% (0% a 69%), mientras que con PPACK se observó un valor del 19.95% (0% a 52.3) de inhibición.



Proliferación inducida por LBA (FPI)



Proliferación inducida por LBA (sarcoidosis)

Debido a que se encontraron niveles bajos de trombina en las muestras de LBA de pacientes con FPI y sarcoidosis ya que no se inhibió en forma significativa la proliferación inducida por las mismas con hirudina y PPACK, no se intentó establecer la correlación entre la concentración de trombina presente en estas muestras y la proliferación fibroblástica inducida por estos LBA.

IDENTIFICACION DE OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO PRESENTES EN LBA.

Debido a que se detectó un incremento en la proliferación celular inducida por las muestras de LBA de pacientes con FPI y sarcoidosis, y ésta no pudo ser atribuida a trombina, se buscó la presencia de otros factores de crecimiento, a los que pudiera atribuirse el efecto de estimulación de la proliferación fibroblástica. Se buscó la presencia de tres factores de crecimiento reportados como estimuladores de la proliferación de fibroblastos de pulmón: el PDGF, el TGF β y el IGF-1, mediante el uso de anticuerpos neutralizantes de la actividad biológica de cada uno de éstos. En cada uno de los experimentos que a continuación se muestran, se trabajó con un control empleando el antígeno y el anticuerpo correspondiente y de los distintos factores de crecimiento y anticuerpos solos.

El anticuerpo anti-IGF-1 (KabiGen, Sweden) se empleó en una dilución 1:4000, el anticuerpo anti-PDGF (British Biotechnology, Oxford, U.K.) se usó en una dilución de 50 μ g/ml y el anticuerpo anti-TGF β (British Biotechnology, Oxford, U.K.) en una dilución de 100 μ g/ml. Las concentraciones de factores de crecimiento empleadas fueron: PDGF 5 ng/ml, TGF β 1 ng/ml, e IGF-1, 1×10^{-8} M. Las concentraciones óptimas de cada anticuerpo así como las dosis óptimas de los tres factores de crecimiento empleados, fueron determinadas previamente por la Dra. A. Cambrey.

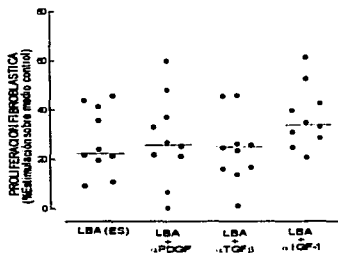


Como se observa en la figura, para los controles, se observó que el PDGF y el IGF-1 incrementaron significativamente (*) la proliferación fibroblástica en un 29.4% ($p < 0.05$) y $20.16\% \pm 0.8$ ($p < 0.05$) respectivamente, sobre el medio control. El TGF β , en cambio, indujo una inhibición en la proliferación de $-4.1\% \pm 0.5\%$ ($p < 0.05$). Estos efectos fueron bloqueados totalmente en el caso del PDGF,

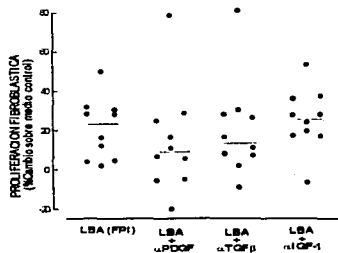
parcialmente en el caso del IGF-1 y revertido para el TGF β por sus anticuerpos específicos. Por su parte los anticuerpos del anti-PDGF (α PDGF, 0.32% \pm 1%) y anti-TGF β (α TGF β , 3.07% \pm 1.9%), no mostraron ningún efecto significativo en la proliferación de los fibroblastos IMR 90 por sí mismos. Mientras que el anticuerpo anti-IGF-1 (α IGF-1) indujo una estimulación en la proliferación fibroblástica (9.82% \pm 1%).

I) PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR LBA (ES , FPI, Y SARCOIDOSIS) EN PRESENCIA ANTICUERPOS ANTI-PDGF, ANTI-TGF β Y ANTI-IGF-1.

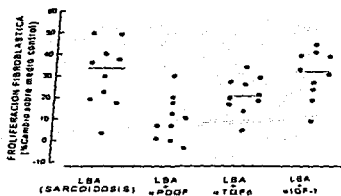
En las siguientes figuras se observa el efecto de los anticuerpos neutralizantes de actividad biológica del PDGF, IGF-1 y TGF β , en la proliferación fibroblástica inducida por muestras de LBA (1/64) de pacientes con ES y FPI. Ninguno de los anticuerpos empleados redujeron significativamente la proliferación celular inducida por los LBA. Las medianas de la proliferación observadas para las muestras de LBA de los pacientes con ES fueron en cada caso de 22.3% (0.56% á 60.1%), 24.3% (1.4% á 46.1%) y 34.3% (21.1% á 61.3%) respectivamente. El anti-IGF-1 incremento ligeramente la proliferación celular (no hubo significancia estadística), mientras que para las muestras de LBA de los pacientes con FPI, se observó que el anti-PDGF y el anti-TGF β disminuyeron la proliferación fibroblástica con valores medios de 8.8% (-20% á 78.6%) y 13.6% (-9.1% á 80.9%) respectivamente. El anti-IGF-1 indujo en cambio un ligero incremento en la proliferación (51.63%; -6.6% á 53.4%).



Proliferación inducida por LBA (ES) en presencia de anticuerpos



Proliferación inducida por LBA (FPI) en presencia de anticuerpos.



Proliferación inducida por LBA (sarcoidosis)

destacar el hecho de que para todos los experimentos realizados con anticuerpos neutralizantes de actividad biológica (anti-PDGF, anti-IGF-1 o anti-TGFβ), los valores de disminución en la proliferación fibroblástica en cada muestra no disminuyen en forma lineal.

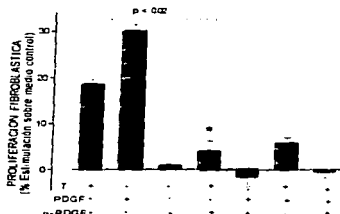
MECANISMO DE PROLIFERACION INDUCIDO POR LA TROMBINA.

Considerando los hallazgos mostrados, en cuanto a la inducción de la proliferación inducida por la trombina pura y la presente en las muestras de LBA de pacientes con ES. y aún cuando esto no se contempló originalmente dentro de los objetivos del presente trabajo. Se intentó dilucidar el mecanismo de acción de la trombina para inducir un incremento en la estimulación de la proliferación fibroblástica.

Algunos autores (Benezra, 1992, 1993, Ohba, 1994, etc) han explicado el efecto de estimulación inducido por la trombina en fibroblastos, vía la liberación de otros factores de crecimiento. Estos autores sostienen, que la trombina induce la expresión o la liberación de factores de crecimiento activos, almacenados en forma latente en la matriz extracelular (PDGF, TGFβ, etc.) y que éstos son los que estimulan la proliferación fibroblástica. A fin de dilucidar si la trombina estimula por sí misma la proliferación de fibroblastos de pulmón, o bien lo hace vía otros factores de crecimiento, se siguieron dos estrategias. Primeramente se intentó inhibir la estimulación de la proliferación inducida por la trombina pura, en los fibroblastos IMR 90 empleando anticuerpos anti-PDGF y anti-TGFβ. Después se realizó una cinética de proliferación celular con diferentes concentraciones de trombina con tiempos de reacción de menos de 24 horas, de tal manera que si se observara algún efecto, éste pudiera

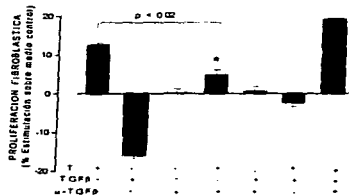
ser atribuido estrictamente a la trombina y no a los factores de crecimiento liberados por éste después de cierto tiempo.

1) PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR TROMBINA EN PRESENCIA DE ANTI-PDGF Y ANTI-TGF β .



Como se observa en la figura, después de 48h de cultivo, el PDGF (5 ng/ml) y la trombina (T) (2×10^{-11} M) por sí mismos, indujeron una estimulación del 30.13 ± 1.3 % y del 18.69 ± 0.9 % respectivamente. Dicha estimulación fue significativa con respecto al control ($p < 0.02$). El anti-PDGF solo, no indujo ningún cambio significativo en la proliferación con respecto al medio control (0.96 ± 0.6 %). Sin embargo, cuando se adicionó trombina en presencia de

anti-PDGF (100 μ g/ml), la proliferación celular inducida por trombina se redujo significativamente (*) en un 78% ($p < 0.02$). Debe mencionarse que aunque en el control del sistema: PDGF + α PDGF se inhibió significativamente la proliferación inducida por este factor de crecimiento, al adicionar trombina y PDGF juntos (estimuladores de la proliferación fibroblástica), se observó una aparente inhibición de la proliferación, lo que podría explicarse como una limitante del sistema de evaluación que tiene un aparente límite de saturación.

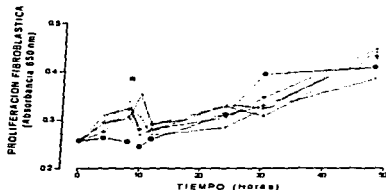


observó una disminución significativa (*) de la proliferación celular inducida por trombina del 61.8 % ($p < 0.02$).

En este caso la trombina (2×10^{-11} M) indujo un incremento en la proliferación fibroblástica (12.64 ± 0.5 %), mientras que el TGF β (1 ng/ml) como se esperaba a la dosis probada, inhibió la proliferación (-19.16 ± 0.6 %). El anticuerpo anti-TGF β no indujo por sí sólo ningún efecto significativo sobre la proliferación (0.25 ± 1 %). Al adicionar la mezcla anti-TGF β - trombina (T) al cultivo, se

II) CURVA DOSIS RESPUESTA A TROMBINA EN DIFERENTES TIEMPOS

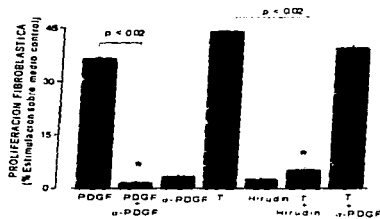
Una vez comprobado que el efecto de estimulación en la proliferación fibroblástica inducido por la trombina era inhibido por anticuerpos anti-PDGF y anti-TGF β , al menos en forma parcial, se intentó corroborar el efecto ejercido por esta proteasa de serina, realizando una cinética de proliferación a tiempos cortos.



Independientemente de la dosis de trombina empleada (0.06×10^{-10} M a 1×10^{-10} M, cuadros, círculos y triángulos abiertos, taches y cruces en la gráfica), en los diferentes tiempos (0, 4, 8, 10, 12, 24, 30 y 48 horas), se observó una tendencia semejante en todas las dosis probadas. Destacó un punto de estimulación máxima por trombina a las 8 horas. Este mostró diferencia significativa (*) con respecto a las absorbancias observadas en el medio control ($p < 0.05$), que se ejemplifica en la figura como los círculos cerrados.

III) PROLIFERACION INDUCIDA POR TROMBINA (8 Hrs) PREVIA INHIBICION CON HIRUDINA Y PPACK

A fin de corroborar si el efecto de estimulación en la proliferación fibroblástica observado a las 8 horas era atribuible solamente a trombina, se realizó un experimento semejante al mostrado en el inciso i) de la presente sección, pero ahora a este tiempo de cultivo (8 h) y en presencia de hirudina y de anti-PDGF.



Al tiempo de estimulación máxima de 8 horas, la proliferación fibroblástica inducida por trombina (T) a una dosis de 2×10^{-11} M, se logró inhibir significativamente (*) ($p < 0.02$), hasta en un 88.3% en presencia de hirudina (H) (6×10^{-9} M), como se observa en la figura. En cambio dicha proliferación fibroblástica no pudo ser inhibida por el anticuerpo anti-PDGF.

EFFECTO INDUCIDO POR TROMBINA EN FIBROBLASTOS DE UN PACIENTE (FPI)

Para finalizar con esta sección de dilucidación de los efectos inducidos por la trombina pura o presente en LBA de pacientes con fibrosis pulmonar, se planteó la hipótesis de que si bien se han demostrado algunos efectos interesantes inducidos por esta proteasa de serina en fibroblastos de pulmón humano normal, sería interesante conocer su efecto en fibroblastos de pacientes con fibrosis. Se esperaba que éstos respondieran de forma cualitativa o cuantitativa diferente a lo observado en las células normales.

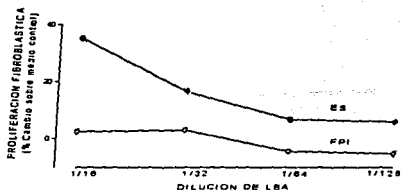
Debido a que sólo se contaba con algunos cultivos primarios obtenidos de biopsias pulmonares de pacientes con FPI y ES (obtenidos por el Dr. N. Kim Harrison previamente), solo se empleo el cultivo de un paciente con FPI (en el 4° pasaje) para el desarrollo de los siguientes experimentos. Se probó el efecto de la trombina pura en la proliferación celular de estos fibroblastos y su posible inhibición inducida por hirudina y PPACK. Además se probó el efecto de la trombina presente en dos muestras de LBA de dos pacientes, uno con ES y otro con FPI en las mismas células del paciente con FPI.

i) PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR TROMBINA Y SU INHIBICIÓN POR HIRUDIN Y PPACK EN FIBROBLASTOS (FPI).



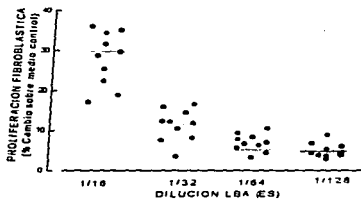
Como se observa en la gráfica la trombina (T) indujo un incremento en la proliferación de los fibroblastos del paciente con FPI, semejante al inducido en fibroblastos fetales T(N), pero en este último caso la estimulación fué significativamente mayor ($p < 0.05$). Esta proliferación celular inducida por trombina en fibroblastos provenientes del paciente con fibrosis pulmonar fué inhibida completamente por hirudina (T+H) y PPACK (T+P) ($p < 0.02$).

ii) PROLIFERACION INDUCIDA POR LBA DE PACIENTES CON FPI Y ES EN FIBROBLASTOS (FPI)



muestras de LBA de los pacientes con ES (10) en diluciones 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128 en los fibroblastos del paciente con FPI, a continuación se muestran los resultados.

III) PROLIFERACIÓN FIBROBLÁSTICA INDUCIDA POR LBA (ES) EN FIBROBLASTOS(FPI).



2.9% a 8.9% de estimulación de la proliferación sobre el medio control respectivamente. Dichos valores de incremento en la proliferación celular son significativamente más bajos que los inducidos por las mismas muestras en los fibroblastos fetales ($p < 0.05$).

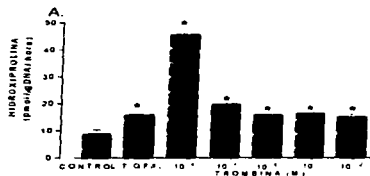
El LBA del paciente con FPI, con baja concentración de trombina no indujo ningún efecto significativo en la proliferación de los fibroblastos del paciente con FPI. En cambio el LBA del paciente con ES con alta concentración de trombina, indujo un incremento en la proliferación de los fibroblastos de pulmón de paciente con FPI superior al observado en los fibroblastos fetales ($p < 0.05$). Considerando estos resultados, se probó el efecto de todas las

La figura muestra un efecto semejante al inducido por los mismos LBA en los fibroblastos de pulmón fetal. Se observa un efecto dosis respuesta, donde a la dilución 1/16 se obtuvo un valor medio de estimulación máxima de la proliferación celular del 29.25%; (17.1% a 35.12%). Para las diluciones 1/32, 1/64 y 1/128 se observaron medianas del 12.1%; 3.5% a 16.6%, 13.92%; 3.3% a 10.6%, y 4.9%;

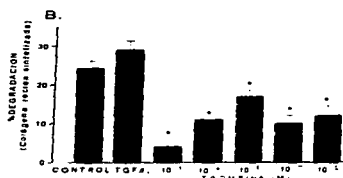
MODULACION DEL METABOLISMO DE COLAGENA INDUCIDO POR TROMBINA

1) EFECTO INDUCIDO POR LA TROMBINA EN LA SINTESIS Y DEGRADACION INTRACELULAR DE COLAGENA

La modulación del metabolismo de la colágena inducido por la α -trombina (Sigma Chemical Co.), en cultivos de fibroblastos HLF-1, se muestra a continuación. Se empleó TGF β_1 (1 ng/ml) como control positivo de inducción de la síntesis de colágena. Así mismo se trabajó siempre con un control al que solo se le adicionó el medio de pre-incubación. Además se probaron diferentes concentraciones de trombina (1×10^{-12} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-9} M y 1×10^{-8} M). A continuación se muestra el efecto inducido por la trombina en la (A) síntesis y (B) degradación de procolágena en los fibroblastos HLF-1. Los resultados se expresan como pmol de hidroxiprolina/ μ g DNA/hora. En las gráficas que se mostrarán a continuación, cada barra representa el promedio \pm el error estándar de seis réplicas. La diferencia significativa de los valores con respecto al control se indicó con un asterisco (*).



En la gráfica A se observa que la síntesis de procolágena en fibroblastos HLF-1, se incrementó en forma significativa (*) en presencia de todas las dosis empleadas de trombina ($p < 0.01$). Se observó un efecto dosis respuesta no muy marcado después de la dosis 1×10^{-9} M de trombina. El efecto máximo de estimulación (45.6 ± 0.5 pmol HYP/ μ g DNA/h) en la producción de procolágena por trombina, se presentó a una dosis de 1×10^{-9} M. Esta estimulación representó tres veces mayor estimulación que la inducida por el control positivo TGF β_1 , quien a su vez indujo una estimulación de la producción de la procolágena del 78% sobre el medio control ($p < 0.02$).



En la gráfica B se muestra el efecto de la trombina en la degradación intracelular de la procolágena recién sintetizada. Los datos se expresaron como un porcentaje de la procolágena total sintetizada. Se observó una disminución de la degradación intracelular de la colágena recién sintetizada, inducida por trombina a todas las dosis probadas. Este efecto en la degradación fue dosis dependiente. El control positivo (TGF β) no indujo ningún cambio significativo en la degradación de la procolágena con respecto al medio control.

II) INHIBICION DEL EFECTO INDUCIDO POR LA TROMBINA EN EL METABOLISMO DE COLAGENA.

El experimento anterior se repitió pero ahora en presencia de hirudín, el inhibidor específico de la trombina. En cuanto a la síntesis de procolágena, se observó que la actividad inducida por trombina (1×10^{-8} M), se inhibió en un 77%, mientras que en la degradación, no se observó ningún efecto significativo con respecto al control (estos datos no se muestran).

IDENTIFICACION DE PROTEINAS EN MUESTRAS DE LBA

I) CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS Y ALBÚMINA

Primeramente se cuantificó la concentración de proteínas totales y albúmina en cada una de las muestras de LBA de los diferentes pacientes, mediante la realización de curvas estándar de proteína y albúmina ($r=1.0$ y 0.99 respectivamente). Posteriormente las proteínas presentes en las diferentes muestras de LBA, se identificaron por peso molecular mediante el uso de geles de poliacrilamida.

II) DETERMINACION DE PROTEINAS EN MUESTRAS DE LBA

CUADRO 2.
PROTEINAS TOTALES EN MUESTRAS DE LBA

PACIENTES	ES	FPI	SARCOIDOSIS	NORMAL
1	0.98	0.99	1.27	0.25
2	1.53	2.64	1.68	0.33
3	2.13	1.56	2.35	0.17
4	1.28	1.35	3.50	0.57
5	1.55	1.67	1.87	0.24
6	1.35	2.34	2.69	0.45
7	0.33	3.04	3.15	0.39
8	2.69	1.03	2.89	0.25
9	1.02	1.82	2.48	0.78
10	1.73	2.36	2.95	0.59
11				0.83
12				0.52

Las concentraciones de proteína total se expresan en mg/ml.

Como puede verse en el cuadro 2, las concentraciones de proteína total cuantificadas en las muestras de LBA de los pacientes con ES, FPI o sarcoidosis fueron mayores que las encontradas en los LBA de los voluntarios sanos (0.42 mg/ml; 0.17 a 0.78 mg/ml, $p < 0.05$). Las medianas de la concentración de proteína encontradas en cada caso fueron de 1.45 mg/ml (0.33 a 2.69 mg/ml), 1.75 mg/ml (0.99 a 3.04 mg/ml) y 2.58 mg/ml (1.27 a 3.5 mg/ml) respectivamente. No hubo diferencia significativa entre las concentraciones de proteína encontradas entre los diferentes grupos de pacientes con ES, FPI y sarcoidosis.

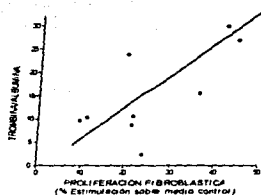
CUADRO 3
CONCENTRACION DE ALBUMINA EN MUESTRAS DE LBA

PACIENTES	ES	FPI	SARCOIDOSIS	NORMAL
1	0.81	0.47	1.90	0.33
2	1.45	2.82	4.29	0.77
3	1.81	5.81	4.16	0.56
4	0.93	0.49	6.38	0.54
5	0.88	0.73	1.58	1.04
6	1.10	0.21	3.51	0.85
7	0.49	1.71	0.87	1.09
8	3.46	0.81	1.49	0.52
9	0.35	0.78	2.09	1.83
10	1.35	1.00	2.93	2.32
11				0.73
12				0.52

Las concentraciones de albúmina se expresan ($\times 10^{-9}$ M).

La mediana de la concentración de albúmina en los LBA de los pacientes con ES 1.05×10^{-9} M (0.35 a 3.46×10^{-9} M), FPI 0.79×10^{-9} M (0.21 a 5.81×10^{-9} M), y Sarcoidosis 2.51×10^{-9} M (0.87 a 6.38×10^{-9} M), son semejantes a los encontrados en las muestras de LBA de los voluntarios sanos 0.75×10^{-9} M (0.3 a 2.32×10^{-9} M). Esta diferencia no resultó estadísticamente significativa al comparar los grupos de pacientes con el grupo control.

Los niveles de trombina (M) encontrados en las muestras de LBA de pacientes con ES se dividieron entre la concentración de albúmina (M) encontrada en cada muestra. Como se observa en la siguiente gráfica (escatograma) se encontró la misma tendencia antes observada. Como se observa en la gráfica, el mismo fenómeno se demostró al considerar la relación trombina/albumina en relación a la proliferación celular inducida por cada muestra. La correlación observada en este caso fué aun significativa ($r=0.72$).



IDENTIFICACION DEL PESO MOLECULAR DE PROTEINAS DEL LBA (SDS-PAGE).

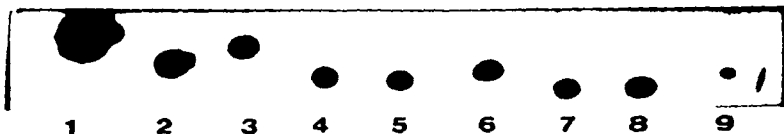
Una vez cuantificada la cantidad de proteína total y albúmina presentes en las muestras de LBA, se procedió a identificar por peso molecular a las otras proteínas presentes en las diferentes muestras de LBA. Sólo se separaron por electroforesis en acrilamida una muestra de LBA de cada uno de los grupos de trabajo. En las cinco muestras evaluadas, se observaron bandas de aproximadamente el mismo peso molecular. (ver figura más adelante).

INMUNOELECTRO-TRANSFERENCIA PARA IDENTIFICACION DE TROMBINA EN LBA

Una vez identificado de modo general el peso molecular de algunas de las proteínas presentes en las diferentes muestras de LBA, se procedió a confirmar la presencia de trombina en algunas de las muestras de pacientes con ES mediante el uso de la inmunoelectro-transferencia.

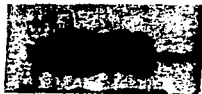
1) CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DEL ANTICUERPO ANTI-TROMBINA.

Diluciones del anticuerpo anti-trombina empleadas: 1) 1:100, 2) 1:500, 3) 1:1000, 4) 1:1500, 5) 1:2000, 6) 1:2500, 7) 1:3000, 8) 1:3500, 9) 1:4000.



Debido a que el anticuerpo anti-trombina distribuido en forma comercial no había sido empleado para análisis de western blot, primeramente se estandarizó la concentración óptima de anticuerpo a emplear. Como puede verse en el análisis de dot blot, incluso las diluciones más bajas del anticuerpo probadas (1:3,500), produjeron una señal nitida. Sin embargo, se optó por trabajar con la dilución 1:500 del anticuerpo a fin de asegurar una buena señal en el western blot.

II) INMUNOELECTRO-TRANSFERENCIA DEL ESTÁNDAR DE TROMBINA (SDS-PAGE 12.5%)

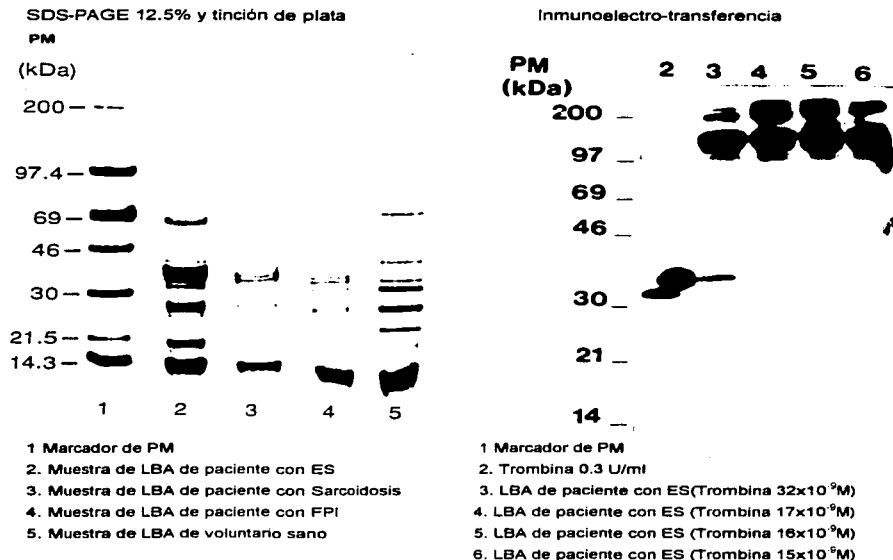


1 2 3

A fin de confirmar que el anticuerpo interactuaba con su antígeno (trombina), en forma adecuada se realizó un western blot de prueba, en el que se separaron por electroforesis en acrilamida diferentes diluciones de trombina (1: 0.6 U/ml, 2: 0.3 U/ml y 3: 0.15 U/ml). Las bandas se transfirieron a una membrana y se realizó la inmunodetección de trombina por ECL tal como se describió en la sección de métodos. Como se observa en la figura, sólo se logró obtener una señal nitida para las dos primeras concentraciones de trombina empleadas. Debido a que éstas se encuentran en el intervalo de concentraciones de trombina encontradas en las muestras de LBA, se prosiguió con la identificación de trombina en 4 muestras de LBA de pacientes con ES:

III) INMUNOELECTRO-TRANSFERENCIA PARA TROMBINA PRESENTE EN LBA (ES).

A fin de verificar la presencia de la trombina en las muestras de LBA de pacientes con ES, se separaron por electroforesis en acrilamida (12.5%) 4 muestras de LBA de pacientes con ES. Estas muestras se separaron en condiciones normales (carriles 3-6). En el mismo gel se corrió un control positivo en el que se añadieron 0.3U/ml de trombina pura (carril 2) y un marcador de peso molecular de 14 á 200 Kda (carril 1).



La electroforesis en SDS, mostró que en la muestra de LBA del paciente con ES se identificaron bandas para productos de peso molecular de 20 000, 28 000 y 35 a 37 000 Da. mismas que no se observan con la misma intensidad en las demás muestras.

Para la inmuno-electro-transferencia, puede verse, una banda con el peso molecular aproximado de la trombina (37 000 KDa) sólo para la muestra 3, correspondiente a la muestra de LBA con la concentración más alta de trombina cuantificada. Cabe mencionar que aunque se emplearon las muestras con niveles más altos de trombina, las tres restantes contenían al menos la mitad de la primera. También se observaron bandas con un peso molecular aproximado de alrededor de 200 000 KDa que podrían corresponder a trombina unida a algún otro producto o bien a polímeros de esta proteasa de serina.

EXPRESION GENICA DE LA PROCOLAGENA α 1(I) INDUCIDA POR TROMBINA

A fin de confirmar si el efecto inducido por la trombina en el metabolismo de colágena de los fibroblastos HLF-1 se regulaba a nivel la de expresión génica de la procolágena, se realizó un experimento idéntico al realizado para evaluar el metabolismo de colágena inducido por trombina, pero en esta ocasión se extrajo el RNA total y se realizó un análisis por Northern blot para identificar la expresión génica de la cadena α (1) de la procolágena tipo I.

A.**B**

1 2 3 4 5 6 7

1. Control
2. TGF β ₁ (1 ng/ml)
3. Trombina 1×10^{-8} M
4. Trombina 1×10^{-9} M

5. Trombina 1×10^{-10} M
 6. Trombina 1×10^{-11} M
 7. Trombina 1×10^{-12} M
- A. Hf 667. B. GADPH

Como se observa en la figura, el control positivo (TGF β ₁, 1 ng/ml) indujo un aumento en la expresión génica de la procolágena α (1) muy semejante al inducido por trombina a una dosis de 1×10^{-8} M. La trombina indujo un incremento en la expresión génica de la procolágena en forma dosis dependiente, a dosis 1×10^{-12} M se observó un expresión muy semejante a la del control. Además se trabajó con un control de hibridación interna (hibridación con la sonda para el gene GADPH), para verificar que todas las muestras poseían aproximadamente la misma cantidad de RNA total.

RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se cuantificaron altas concentraciones de trombina en muestras de LBA de pacientes con ES. No así en LBA de pacientes con FPI y sarcoidosis.

- 2. Todas las muestras de LBA de pacientes con ES, FPI y sarcoidosis indujeron un incremento en la proliferación de fibroblastos IMR 90.**
- 3. Se encontró una correlación significativa entre los altos niveles de trombina encontrados en las muestras de LBA de los pacientes con ES y la proliferación celular inducida por dichas muestras.**
- 4. La proliferación celular inducida por las muestras de LBA, fué bloqueada significativamente, sólo en las muestras de LBA de pacientes con ES por inhibidores específicos de trombina (hirudín y PPACK).**
- 5. Bloqueando con anticuerpo anti-PDGF, Se determinó indirectamente la proliferación celular inducida por estas muestras de LBA de pacientes con sarcoidosis.**
- 6. La trombina actúa por sí misma, induciendo proliferación fibroblástica en las primeras 8 h de cultivo. Después de este tiempo puede actuar mediada por PDGF.**
- 7. La trombina indujo una mayor expresión génica de la procolágena $\alpha(1)$ I a una dosis de 1×10^8 M.**
- 8. La trombina indujo un incremento en la síntesis de la procolágena mientras y un decremento en la degradación intracelular de colágena.**

CAPITULO 4

**MODULACION DE LA RESPUESTA BIOLOGICA INDUCIDA EN
FIBROBLASTOS DE PULMON HUMANO, POR EL FACTOR DE
CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β Y TRES DE SUS FORMAS
ESTRUCTURALES (TGF β 1-3)**

I. MATERIAL Y METODOS

CULTIVO CELULAR

Se trabajó con fibroblastos fetales de pulmón humano HLF-1 (pase 13-16, ATCC, Rockville, MD., USA), los procedimientos del cultivo y el mantenimiento de la línea, se efectuaron en las mismas condiciones mencionadas en el capítulo anterior. Además se trabajó con 6 diferentes tipos de fibroblastos de pulmón humano adulto, obtenidos por explante de pacientes con fibrosis pulmonar. Tres de éstos provenientes de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y tres de pacientes con fibrosis pulmonar asociada a esclerosis sistémica. Dichos explantes fueron obtenidos en el laboratorio del Dr. Laurent por el Dr. N. Kim Harrison y siempre se usaron entre los pasajes 3 a 5.

ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR

Para determinar el efecto inducido por el TGF β ₁ (recombinante, secuencia humana, British Biotechnology, Oxford, U.K.), TGF β ₂ (de origen porcino natural, British Biotechnology, Oxford, U.K.), y el TGF β ₃ (recombinante, secuencia de pollo, British Biotechnology, Oxford, U.K.), en la proliferación de los fibroblastos de pulmón humano HLF-1, se trabajó con el mismo ensayo de proliferación, basado en el empleo del colorante azul de metileno, que se describió en el capítulo anterior. La homología entre el TGF β ₂ y el TGF β ₃ empleados y su contraparte humana es mayor al 87%.

En este caso, se uso un amplio intervalo de dosis de cada una de las diferentes formas estructurales del TGF β (0.03 a 5 ng/ml y 5 a 160 pg/ml). El primer intervalo de dosis de cada una de las formas estructurales del TGF β , resultó inoperante en el sistema; ya que no sólo indujo una inhibición de la proliferación celular (efecto ampliamente documentado para este factor de crecimiento, a altas dosis y en algunos tipos celulares como fibroblastos de piel y células de músculo liso), sino que además, las células se desprendieron de la placa y fue imposible realizar la evaluación del ensayo. Debido a esto en lo sucesivo solo se trabajo con el segundo intervalo de dosis de TGF β 1,3.

La validación del ensayo de proliferación celular, se realizó como se mencionó en el capítulo anterior, por lo que en este capítulo ya no se repitió la presentación de este tipo de resultado. El mismo ensayo de proliferación antes descrito y empleando las dosis de TGF β

que se especificaron, se uso en los fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar para determinar así, su efecto en este tipo de fibroblastos.

Una vez determinado el efecto de las diferentes formas estructurales del TGF β , en la proliferación celular de fibroblastos normales y de pacientes con fibrosis, y aunque esto no estaba establecido en los objetivos particulares del presente trabajo, se intentó dilucidar el mecanismo de inhibición de la proliferación fibroblástica inducido por el TGF β . Se estableció la hipótesis de que la acción del TGF β y cada una de sus formas estructurales en estudio estaba mediado por PEG₂, así que realizando el mismo ensayo de proliferación celular, se incubaron fibroblastos HFL-1 a 3 diferentes dosis de cada TGF β 1-3 (160, 80 y 5 pg/ml, dos de ellas con efecto inhibitorio), y en presencia de un inhibidor de la PEG₂: la indometacina en concentración 1 μ g/ml.

Finalmente se realizaron algunos experimentos, en los que se intentó bloquear la actividad de inhibición inducida por las diferentes formas del TGF β , en la proliferación fibroblástica. Con este propósito se empleó un anticuerpo anti-TGF β bloqueador de actividad biológica. Se usaron las mismas dosis, mismos controles y mismas condiciones establecidos para los experimentos descritos en el capítulo 3 en los que se trabajó con el mismo anticuerpo.

METABOLISMO DE COLAGENA

El método para evaluar el metabolismo de colágena inducido por las diferentes formas estructurales del TGF β 1,3, se describió en la sección de métodos del capítulo 3. En este caso, se emplearon dosis de TGF β 1,3 de 0.3 a 5 ng/ml. Estos experimentos fueron desarrollados por la Dra. R. Cocker, sin embargo los resultados se incluyeron en el presente trabajo, ya que además de constituir parte de los objetivos inicialmente planteados, permitieron establecer correlaciones interesantes entre la actividad biológica del TGF β 1,3 en fibroblastos. Dichas correlaciones podrían tener repercusiones interesantes en el establecimiento de procesos fibróticos.

QUIMIOTAXIS

Los fibroblastos fetales de pulmón humano (HLF-1), se crecieron en DMEM suplementado con NCS al 10% durante 72 horas (densidad 28×10^5 células/cm²). Una vez confluentes, se incubaron durante 1 h con medio DMEM sin suero y posteriormente se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de quimiotaxis (DMEM + 1% albúmina sérica

humana, Sigma Chemical Co. Ltd. Poole Dorset, UK), hasta lograr una concentración final de 3.5×10^6 células/ml. Los experimentos de quimiotaxis se realizaron en cámaras modificadas de Boyden de 48 micropozos (Neuro-probe, Cabin John MD., USA), empleando membranas de policarbonato con poros de $8 \mu\text{m}$ de diámetro (Nucleopore, Cabin John, MD. USA), cubiertas previamente con colágena tipo I (Sigma Chemical Co., Ltd. Poole Dorset, UK). Las cámaras se incubaron durante 5 horas para permitir la migración celular a 37°C en un ambiente húmedo y al 5% de CO_2 .

Se trabajó con un amplio intervalo de concentraciones de cada una de las diferentes formas estructurales del TGF $\beta_{1,2}$ (2.5 ng/ml a 5 pg/ml). En cada experimento de quimiotaxis, se empleó medio de quimiotaxis y PDGF (British Biotechnology, Oxford, U.K., concentración previamente optimizada, ver sección de resultados) como control negativo y positivo respectivamente. Después de 5 horas de incubación, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con colorante Prodiff (Braidwood Lab., Beckenham, Kent, UK).

Posteriormente las membranas se montaron en porta-objetos y se cuantificó el número de células que migraron, contando 10 campos predeterminados a 100X (HPF, "high-power fields"). Al menos tres experimentos se realizaron con cada una de las formas estructurales del TGF β . En cada uno de estos se trabajó con cuadruplicados de cada punto. Los resultados se expresaron como el promedio de los experimentos \pm la desviación estándar, después de haber restado el número de células que migraron en el control negativo (medio de cultivo solo). Generalmente entre 3 y 5 células/10 HPF.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan como promedios y desviaciones estándar y las diferencias estadísticas entre los diferentes puntos, se determinaron empleando la prueba para datos paramétricos de t de Student. Un valor de $p < 0.05$ fué considerado como significativo.

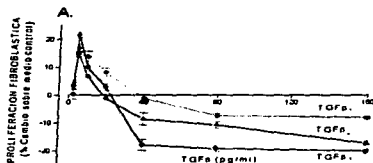
II. RESULTADOS

PROLIFERACION CELULAR

EFEECTO DE TGF β ₍₁₋₃₎ EN LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS (HLF-1).

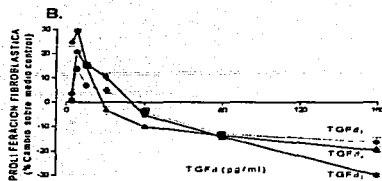
Se emplearon las condiciones de cultivo optimizadas en el capítulo 3. Es decir, se trabajó con 6×10^3 células sembradas en 100 μ l de medio DMEM, suplementado con NCS al 0.8%, mismas que se preincubaron por 24 horas. Posteriormente, se adicionaron las diluciones de los diferentes TGF β preparadas en DMEM suplementado con NCS al 0.4%. En este caso se trabajó en la mayor parte de los experimentos a 24, 48 y 72 horas de incubación debido a los hallazgos encontrados.

Debido a que las dosis de 0.3 a 5 ng/ml de TGF β fueron aparentemente tóxicas, e indujeron que las células se desprendieran de la placa de cultivo, e imposibilitaron la evaluación del ensayo, sólo se trabajó con el intervalo de dosis de 2.5 a 160 μ g/ml. A continuación se muestra el efecto de cada una de las tres formas estructurales del TGF β en la proliferación de los fibroblastos HLF-1 a diferentes tiempos de incubación 24, 48 y 72 h.

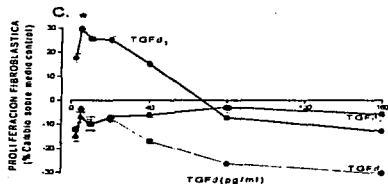


Como se observa en la figura A, las tres formas estructurales del TGF β indujeron un efecto semejante en la proliferación de los fibroblastos HLF-1 a las 24 horas de incubación. No se encontró ninguna diferencia significativa entre éstas, todas indujeron una inhibición de la proliferación celular a dosis altas (40 a 160 μ g/ml), mientras que a dosis bajas, se observó una

estimulación con un pico máximo de $16.8 \pm 1.4\%$, $14.9 \pm 0.5\%$ y $21.5 \pm 1.1\%$ para TGF β 1, 2 y 3 a una dosis de 5 μ g/ml respectivamente. Dicha estimulación fué significativa con respecto al medio control ($p < 0.05$). Cabe mencionar que el TGF β 3 indujo un efecto de inhibición mayor al observado en cualquiera de las otras dos formas estructurales del TGF β . Este efecto fué altamente reproducible.



En la gráfica B, se muestra el efecto de los tres TGFβ en la proliferación de fibroblastos HLF-1 después de 48 h de incubación. En este caso, aunque se observa la misma tendencia antes mencionada a las 24 h, es decir, que los tres TGFβ inducen una inhibición a dosis altas (40 - 160 pg/ml) y una estimulación de la proliferación celular a dosis bajas, si se encontró diferencia significativa (*) entre la estimulación inducida por cada forma estructural del TGFβ en el punto de estimulación máxima: 5 pg/ml, concentración a la que se observó una estimulación en la proliferación fibroblástica de $13.9 \pm 0.9\%$, $20.0 \pm 0.5\%$ y $29.6 \pm 0.6\%$ para TGFβ 1, 2 y 3 respectivamente, todas éstas fueron significativas comparadas con el medio control ($p < 0.05$). Las diferencias entre los TGFβ (1, 2 y 3) fueron significativas con un valor de $p < 0.05$ respectivamente.

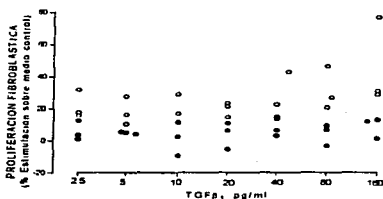


En la gráfica C se observa, el efecto de las formas tres estructurales del TGFβ en la proliferación de los fibroblastos HLF-1 después de 72 h de incubación. Como puede verse en la figura, después de 72 en cultivo los TGFβ 1 y 2 indujeron un efecto inhibitorio en la proliferación fibroblástica, aún a dosis bajas. Mientras que en contraste el TGFβ₃, indujo una estimulación del $29.7 \pm 2\%$ significativa con respecto al medio control ($p < 0.02$).

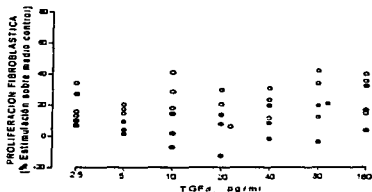
EFFECTO DEL TGFβ₍₁₋₃₎ EN LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR (FPI, ES).

Se trabajó con las 6 muestras de fibroblastos pulmonares de los pacientes con diferentes tipos de fibrosis pulmonar, 3 de ellos con FPI y tres con fibrosis pulmonar asociada a esclerosis sistémica. Cada una de estas líneas celulares, se sometió a un amplio intervalo de

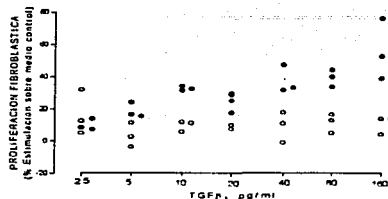
dosis de TGF $\beta_{1,3}$ (2.5 a 160 pg/ml mismo que se empleó en los fibroblastos HLF-1). En este caso, considerando las dificultades obvias del trabajo con cultivos primarios provenientes de pacientes con fibrosis, solamente se evaluó la proliferación celular inducida por TGF β_1 , 2 y 3 a las 72 de incubación.



En la gráfica se muestra el efecto inducido por TGF β_1 en la proliferación de fibroblastos de pacientes con fibrosis. Los círculos cerrados (●) representan las 3 muestras de fibroblastos de pacientes con FPI probados cada uno a diferentes dosis de TGF β_1 , los círculos abiertos (○) representan las 3 muestras de fibroblastos de pacientes con ES. En general puede decirse que el TGF β_1 indujo un pequeño incremento en la proliferación celular de los fibroblastos de pacientes con FPI, sólo una muestra indujo un ligero efecto inhibitorio a dosis a partir de 10 pg/ml. En cambio en los fibroblastos de pacientes con ES, el TGF β_1 indujo una estimulación de la proliferación a todas las dosis probadas y en todas las muestras. Se alcanzaron estimulaciones máximas entre 40 y 50% sobre el medio control.



La proliferación fibroblástica inducida por TGF β_2 en fibroblastos de pacientes con FPI (círculos cerrados, ●) y pacientes con ES (círculos abiertos ○) a todas las dosis probadas, fué muy semejante a la inducida por TGF β_1 . Nuevamente sólo una muestra de fibroblastos de un paciente con FPI indujo un pequeño efecto inhibitorio en la proliferación y en el resto de las muestras (FPI o ES) el TGF β_2 incremento la proliferación independientemente de la dosis empleada. En este caso se observó una mayor dispersión de datos y se obtuvieron estimulaciones en la proliferación con valores promedio máximos entre 30 y 40%.



En esta última gráfica se observa la proliferación celular inducida por TGF β_3 en fibroblastos de pacientes con FPI (círculos cerrados, ●) y ES (círculos abiertos, ○) después de 72 horas de cultivo. En este caso, se observó que en todas las muestras de fibroblastos (ES o FPI), el TGF β_3 indujo un incremento en la proliferación celular, independientemente de la dosis de TGF β empleada, en

ninguna muestra el TGF β_3 mostró un efecto de inhibición de la proliferación. Contrariamente a lo observado en las dos gráficas anteriores (efecto inducido por TGF β_1 y TGF β_2 en fibroblastos de pacientes con ES y FPI), en los fibroblastos de pacientes con FPI el TGF β_3 indujo un incremento en la proliferación celular, mayor al inducido en los fibroblastos de pacientes con ES en este caso se observaron estimulaciones máximas con un promedio de 40 a 50%, invirtiéndose la tendencia observada en los dos casos anteriores.

MECANISMO DE INHIBICION EN LA PROLIFERACION FIBROBLASTICA INDUCIDO POR TGF β

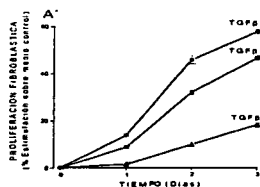
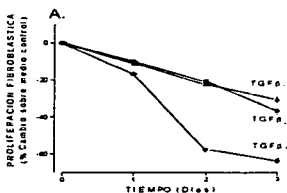
Se ha propuesto que el efecto inhibitorio inducido por TGF β en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano, podría estar mediado por la prostaglandina PGE $_2$ (McAnulty, 1995). Considerando esta hipótesis, se empleó un inhibidor de la PEG $_2$ (indometacina), y se evaluó el efecto inducido por este inhibidor de prostaglandinas, en presencia de TGF $\beta_{1,2}$, en la proliferación de fibroblastos HLF-1.

Se emplearon 3 dosis de cada TGF β , que de acuerdo a los resultados antes mostrados, dos de éstas (160 y 80 pg/ml) inducían inhibición en la proliferación fibroblástica y una, la última dosis (5 pg/ml), que indujo la estimulación máxima observada a las 48 h de incubación para cada TGF β . Estos experimentos se realizaron a diferentes tiempos: 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 días, sin embargo sólo se presentan los resultados observados a las 24, 48 y 72 horas ya que éstos puntos, muestran la tendencia general de los resultados.

EFEECTO DE TGF $\beta_{(1-3)}$ EN LA PROLIFERACION FIBROBLASTICA. EN PRESENCIA O ASUSENCIA DE INDOMETACINA

I) TGF β_{1-3} , 160 pg/ml

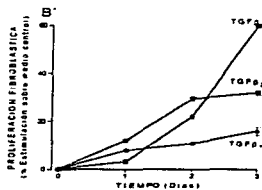
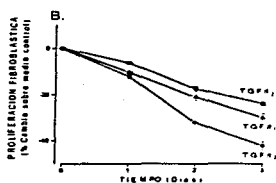
En la gráfica A, se observa el efecto inhibitorio de cada una de las formas estructurales del TGF β a la dosis alta de 160 pg/ml. Aunque este efecto se demostró en la sección anterior, se repitió en paralelo con este experimento como control. Cabe destacar que aunque hay variaciones en los datos específicos, la tendencia general se conserva y se repite el efecto de inhibición mayor inducido por TGF β_3 . En la gráfica A' se observa en cambio, que la indometacina indujo una reversión total, del efecto inhibitorio, inducido por cada una de las diferentes formas estructurales del TGF β . En este caso no se observó inhibición a ningún tiempo de incubación, ni aún después de 72 horas de cultivo. En cambio, se observaron estimulaciones máximas de $18.3 \pm 0.8\%$, $46.6 \pm 0.8\%$ y $57.9 \pm 0.8\%$ para TGF $\beta_{(1-3)}$ respectivamente, y después de 72 horas de incubación.



La reversión del efecto se observó desde las primeras 24 h de incubación, aunque la estimulación máxima se logró hasta los 3 días. Cabe mencionar que la estimulación en la proliferación de los fibroblastos HLF-1, siguió en aumento hasta los 5 días para TGF β_2 y TGF β_3 , y hasta los 6 días para TGF β_1 . Después de este tiempo, se observó una disminución de la proliferación hasta alcanzar estimulaciones promedio de 10, 30 y 45% para TGF $\beta_{(1-3)}$ respectivamente (estos últimos datos no se muestran).

II) TGF $\beta_{(1-3)}$, 80 pg/ml

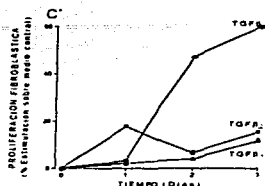
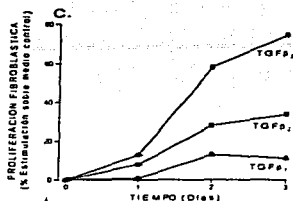
En la gráfica B, nuevamente se observa el efecto de inhibición en la proliferación de los fibroblastos de pulmón HLF-1, inducido por la dosis alta de 80 pg/ml de los TGF $\beta_{(1-3)}$ a diferentes tiempos. El mayor efecto inhibitorio se observó a las 72 horas. Cabe destacar que el TGF β_3 en forma muy reproducible indujo una inhibición de la proliferación mayor a la inducida por las otras dos formas estructurales del TGF β . En la gráfica B', nuevamente se observó que la indometacina, indujo una reversión total del efecto inhibitorio, inducido por cada una de las diferentes formas estructurales del TGF $\beta_{(1-3)}$, a la dosis alta de 80 pg/ml, antes probada como inhibitoria de la proliferación fibroblástica. En este caso, tampoco se observó inhibición a ningún tiempo de incubación. En cambio, se observaron estimulaciones máximas de $15.98 \pm 1.6\%$, $29.4 \pm 0.8\%$ y $61.2 \pm 0.4\%$ para TGF $\beta_{(1-3)}$ respectivamente, y después de 72 horas de incubación.



La reversión del efecto se observó desde las primeras 24 h de incubación, aunque la estimulación máxima se logró hasta los 3 días. Cabe mencionar que la estimulación en la proliferación de los fibroblastos HLF-1, siguió en aumento hasta los 6 días para cada uno de TGF β . Después de este tiempo, se observó una disminución de la proliferación hasta alcanzar estimulaciones promedio de 7, 15 y 23% para TGF $\beta_{(1-3)}$ respectivamente (estos últimos datos no se muestran).

III) TGF $\beta_{(1-3)}$, 5 pg/ml

En la gráfica C, se observa el efecto de estimulación en la proliferación de los fibroblastos de pulmón HLF-1, inducido por la dosis baja de 5 pg/ml de los TGF $\beta_{(1-3)}$ a



diferentes tiempos (1 a 3 días). Cabe destacar que el TGF β_3 , en forma contrastante con su efecto inhibitorio a dosis altas, indujo un efecto distinto a los otros dos TGF β , en este caso, indujo un incremento de la proliferación mayor a la inducida por las otras dos formas estructurales del TGF β . En la gráfica C se observó que la indometacina, no indujo mayor efecto en el efecto inducido por cada una de las diferentes formas estructurales del TGF $\beta_{(1-3)}$, a la dosis baja de 5 pg/ml, antes probada como estimuladora de la proliferación fibroblástica. Se observaron estimulaciones máximas de $11.78 \pm 0.8\%$, $15.4 \pm 0.4\%$ y $61.2 \pm 0.4\%$ para TGF $\beta_{(1-3)}$ respectivamente, y después de 72 horas de incubación.

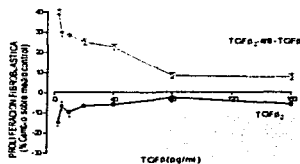
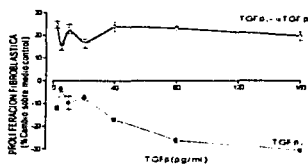
Nuevamente el efecto se observó desde las primeras 24 h de incubación, aunque la estimulación máxima se logró hasta los 3 días. Cabe mencionar que la estimulación en la proliferación de los fibroblastos HLF-1, siguió en aumento hasta los 6 días para cada uno de TGF β . Después de este tiempo, se observó una disminución de la proliferación hasta alcanzar estimulaciones promedio de 1, 4 y 3.8% para TGF $\beta_{(1-3)}$ respectivamente (estos últimos datos no se muestran). Cabe destacar que la indometacina por sí misma no indujo ningún efecto significativo en la proliferación fibroblástica.

EFFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-TGF β EN LA INHIBICIÓN INDUCIDA POR TGF β

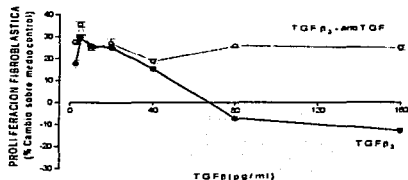
Debido a que las mayores diferencias observadas en el efecto de la proliferación fibroblástica inducido por los diferentes TGF β s, se observó a las 72 horas, los siguientes experimentos se desarrollaron solo a este último tiempo de incubación. A fin de verificar que la inhibición en la proliferación fibroblástica, a dosis altas (40 a 160 pg/ml) de cada uno de los TGF β era atribuible directamente a las diferentes formas estructurales de dicho factor de

crecimiento y no a algún otro factor generado *in situ*, se verificó la actividad inducida por TGF β empleando un anticuerpo bloqueador de actividad biológica de TGF β . Se trabajó en el amplio intervalo de dosis (2.5 a 160 pg/ml) que se había probado antes, a fin de comparar efectos.

Como se observa en las gráficas, el efecto de inhibición inducido por TGF β_1 y TGF β_2 , en la proliferación de fibroblastos HLF-1 después de 72 horas de incubación, fué revertido totalmente por el anticuerpo anti-TGF β a todas las dosis probadas. Se observó un efecto dosis respuesta con una estimulación máxima de $24.7 \pm 1.5\%$ para 2.5 pg/ml de TGF β_1 , y $39.8 \pm 1.5\%$ para 2.5 pg/ml de TGF β_2 .



En esta figura se observa, que el efecto de inhibición inducido por TGF β_3 , en la proliferación de fibroblastos HLF-1, después de 72 horas de incubación, fué también revertido totalmente por el anticuerpo anti-TGF β , a dosis altas (80 a 160 pg/ml).



Cabe destacar que en este intervalo de dosis es donde el TGF β_3 indujo una inhibición de la proliferación. Nuevamente se observó un efecto dosis respuesta con valores de estimulación máxima de $35.8 \pm 1\%$ para 5 pg/ml de TGF β_3 . Es importante hacer notar que a dosis bajas de TGF β_3 (2.5 a 40 pg/ml) el incremento inducido en la proliferación celular por esta forma estructural del

TGF β resultó significativa en el experimento original (comparando con el medio control), y la adición del anticuerpo aparentemente no varió el efecto originalmente inducido por el TGF β , por sí mismo

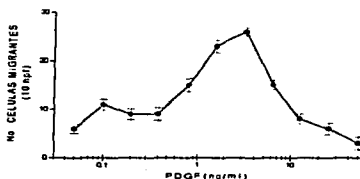
EFFECTO INDUCIDO POR TGF β EN EL METABOLISMO DE LA COLÁGENA

De acuerdo con los resultados obtenidos por la Dra. Cocker, las tres formas estructurales del TGF β ₍₁₋₃₎, estimularon la producción de procolágena y redujeron su degradación intracelular. En cada caso se observaron efectos dosis dependientes en la producción colágena con respuestas máximas de estimulación a concentraciones de TGF β ₍₁₋₃₎ de 0.25 ng/ml y mayores. No se encontró ninguna diferencia significativa en el efecto inducido por las diferentes formas estructurales del TGF β a las 24 h a las que se desarrolló el ensayo de evaluación del metabolismo de colágena en fibroblastos de pulmón.

QUIMIOTAXIS INDUCIDA POR TGF β ₍₁₋₃₎

Antes de iniciar los experimentos de quimiotaxis con las diferentes formas estructurales del TGF β , se estableció la dosis óptima de actividad, del control positivo a emplear en dichos experimentos (PDGF).

Se trabajó con una amplio intervalo de dosis de este factor de crecimiento (0.1 a 50 ng/ml), bien conocido como quimioatrayente para fibroblastos. Una vez caracterizada la respuesta del PDGF en los fibroblastos HLF-1 y seleccionada la dosis óptima de acción, que se emplearía en los demás experimentos, se procedió a evaluar el efecto inducido por cada uno de los TGF β s en dichos fibroblastos de pulmón humano.



Como se observa en la gráfica, el PDGF indujo un efecto dosis respuesta en la proliferación de los fibroblastos HLF-1. La máxima migración estimulada por PDGF (26 ± 3.6 células / 10 HPF), se observó a una dosis de 25 ng/ml. Esta dosis se empleó en experimentos posteriores como control positivo, en esta línea celular.

I) QUIMIOTAXIS INDUCIDA POR TGF $\beta_{(1-3)}$ EN FIBROBLASTOS NORMALES

Ninguna de las dosis probadas de las diferentes formas estructurales del TGF $\beta_{(1-3)}$, indujo quimiotaxis en los fibroblastos de pulmón humano (HLF-1). En cada caso se trabajó con la dosis óptima de PDGF antes mencionada como control positivo. Este indujo una migración celular de 24 ± 3.5 células/10 HPF en la cámara de quimiotaxis en la que se ensayo la actividad quimiotáctica de TGF β_1 , de 31 ± 4.1 células/ 10HPF, en la cámara de quimiotaxis en la que se ensayo la actividad de TGF β_2 , y 25 ± 3 células/ 10HPF en la cámara de quimiotaxis en que se ensayo la actividad de TGF β_3 . Cabe mencionar que cada experimento de quimiotaxis se repitió un promedio de 10 veces, con cuadruplicados de cada punto, observándose los mismos resultados negativos.

II) QUIMIOTAXIS INDUCIDA POR TGF $\beta_{(1-3)}$ EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES

En las mismas células de pacientes con fibrosis pulmonar, empleadas en la evaluación de la proliferación celular inducida por TGF β (3 pacientes con FPI y 3 pacientes con ES), se evaluó el efecto quimiotáctico de las diferentes formas estructurales del TGF $\beta_{(1-3)}$. Nuevamente se observó un efecto semejante al encontrado para los fibroblastos de pulmón fetal HLF-1. Ninguna de las dosis probadas (mismo intervalo que el empleado en proliferación) de las diferentes formas estructurales del TGF $\beta_{(1-3)}$, indujo quimiotaxis en ninguno de los tipos de fibroblastos de pacientes con fibrosis. Cabe mencionar que en cada experimento se probó cada dilución de TGF β por cuadruplicado.

Estos resultados son congruentes con resultados previos (Osornio, 1993), en los que se evaluó el efecto quimiotáctico del TGF β , (de origen porcino y humano) en un amplio intervalo de dosis (0.004pg/ml a 50 ng/ml), en diferentes tipos celulares. Los tipos celulares probados fueron fibroblastos de pulmón de rata, células Swiss 3T3, fibroblastos fetales de piel de rata (SK, ATCC, Rockville, MD., USA) y fibroblastos de prepucio humano (recién nacido) obtenidos por explante. Como control positivo de quimiotaxis inducida por TGF β se emplearon leucocitos mononucleares.

RÉSUMEN DE RESULTADOS

1. Los TGF β_1 , TGF β_2 y TGF β_3 indujeron un efecto dosis respuesta en la proliferación de fibroblastos de pulmón fetal, muy semejante entre sí, en periodos de incubación de 24 y 48 h. A dosis altas, se observó una inhibición de la proliferación celular mientras que a dosis bajas se observó una estimulación de la misma.

2. Después de 72 horas de cultivo, los TGF β_1 , TGF β_2 y TGF β_3 a dosis altas, indujeron un efecto inhibitorio de la proliferación. En cambio, el TGF β_3 , indujo una estimulación de la proliferación celular a dosis bajas en este mismo periodo de incubación.

3. El efecto inhibitorio inducido en fibroblastos de pulmón humano por los tres TGF β (a dosis altas y en periodos de incubación de 72 horas), fué bloqueado completamente por el anticuerpo anti-TGF β y la indometacina (inhibidor de PGE $_2$).

4. Los TGF β_1 y TGF β_2 indujeron efectos similares de estimulación en la proliferación celular (72 horas), independientes de la dosis en fibroblastos de pacientes con FPI y ES. Se observó una mayor estimulación en la proliferación de los fibroblastos (ES).

5. El TGF β_3 indujo un efecto diferente en la proliferación celular (72 horas), de fibroblastos de pacientes con FPI y ES. También indujo un incremento en este parámetro biológico evaluado en forma dosis independiente, sin embargo, en este caso se observó que en los fibroblastos de pacientes con FPI se estimuló en mayor medida la proliferación celular que la observada para los pacientes con ES.

6. Los tres TGF β , indujeron un incremento en la síntesis de la procolágena, y un decremento en su degradación intracelular en fibroblastos HLF-1 en un periodo de 24 horas. No se observó diferencia significativa entre el efecto inducido por cada TGF β .

7. Ninguna de las diferentes formas estructurales del TGF β (1 -3) indujo quimiotaxis en fibroblastos de pulmón humano normal o de pacientes con fibrosis (ES y FPI).

CAPITULO 5

EXPRESION Y SECRECION DE PDGF EN MA ESTIMULADOS POR PARTICULAS INORGANICAS Y LA RESPUESTA QUIMIOTACTICA DIFERENCIAL DE FIBROBLASTOS A LOS DIMEROS DEL PDGF

I. MATERIALES Y METODOS

El presente capítulo se dividió en dos partes, ya que se pretenden dos objetivos diferentes. En la primera de éstas, se busca la caracterización de la actividad biológica diferencial de los diferentes dimeros del PDGF en la quimiotaxis de fibroblastos de pulmón y en la segunda, se estudia el posible efecto inducido en macrófagos alveolares (células que producen PDGF) a nivel de expresión y secreción de este factor de crecimiento después de la activación de dichas células por partículas inorgánicas.

CULTIVO CELULAR

Se desarrolló como se ha descrito en capítulos previos. Se emplearon fibroblastos de pulmón de rata (machos CD, Charles River Laboratories, Raleigh, N.C.), obtenidos por disociación enzimática (Kumar, 1988), células Swiss 3T3 (ATCC, Rockville, MD, USA) y macrófagos alveolares de rata obtenidos como se indica más adelante.

OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES

Los macrófagos alveolares, se obtuvieron de ratas macho (Wistar) con un peso de 200 - 300 g (donados por el Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez). Los animales se sacrificaron por sobredosis con 1 ml de pentobarbital sódico (vía ip., 64 mg/ml) y posteriormente se canuló su tráquea y se extrajeron los pulmones de la cavidad torácica. Se efectuó un lavado broncoalveolar (LBA) de acuerdo al procedimiento descrito (Osomio, 1991). Brevemente, se empleó solución amortiguadora de fosfatos libre de calcio y magnesio, y se aplicó un ligero masaje a los pulmones. Este lavado se repitió hasta colectar 50 ml.

Las células presentes en el LBA se separaron por centrifugación (1500 rpm /10 min/ 4°C), después de dos lavados con solución amortiguadora de fosfatos, las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM (Gibco, BRL, Gaithersburg, MD, USA), suplementado con antibióticos (penicilina - estreptomycin 10000 u/ml, fungizona 25 µg/ml, Sigma Chemical Co. St. Louis MO., USA) y L-glutamina (200 mM, Gibco, BRL, Gaithersburg, MD., USA). Se realizó un conteo celular empleando una cámara de Neubauer y el colorante azul tripano, mismo que permitió evaluar simultáneamente la viabilidad de las células, la cual siempre osciló alrededor del 95%.

Una pequeña alícuota de la suspensión celular se separó del total de la muestra y se dividió en dos partes. Una de éstas se empleó para realizar la prueba de la estearasa inespecífica (Stuart, 1978) y determinar el porcentaje de macrófagos presentes en el LBA y la otra, se usó para realizar una cuenta diferencial (tinción de wright) y determinar el porcentaje y tipo de células presentes en la muestra. El resto de la suspensión celular se sembró en cajas de cultivo de 150 cm² a una densidad de 25×10^5 células/caja. A fin de permitir la adhesión de las células al frasco de cultivo, éstas se incubaron 1 hora a 37°C en un ambiente húmedo y en presencia de 5% de CO₂.

ACTIVACION DE MACROFAGOS ALVEOLARES POR HIERRO

Una vez adheridas las células, se eliminaron las células remanentes del sobrenadante y se procedió a la activación de los macrófagos con hierro carbonilo (Partícula inorgánica no fibrogénica que induce respuestas inflamatorias tempranas, semejantes a las inducidas por partículas fibrogénicas como el cuarzo y el asbesto) (Craighead, 1982, Crouch, 1990, Crystal, 1991). A seis de las cajas, se añadieron 30 ml de DMEM adicionado con 75 mg de esferas de hierro carbonilo con un diámetro de 0.3 - 0.4 μm y libre de endotoxina, homeado a 200°C/4 h (General Aniline, Linden, NJ, USA). La concentración final de hierro en cada caja de cultivo fue de 0.5 mg/cm². A fin de prevenir la adherencia de proteínas a la superficie de la caja de cultivo (libre de células), a cada una de las cajas de cultivo, se le añadió albúmina sérica bovina (1×10^{-6} M, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO: USA).

A fin de determinar el efecto inducido por las partículas de hierro en la viabilidad celular, a lo largo de los diferentes periodos de incubación, en paralelo se trabajó con macrófagos sembrados con la misma densidad en placas de cultivo de 24 pozos. En éstos se determinó la viabilidad celular durante el desarrollo del experimento, por dos métodos diferentes. Se cuantificó la liberación de la enzima citoplasmática deshidrogenasa láctica (DHL), mediante el empleo de un sistema comercial de Merck de México, y además se usó un método fundamentado en el empleo de un colorante de sales de azul de tetrazolio, MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., USA) (Mossman, 1983), que es reducido metabólicamente.

Las células se cultivaron a seis diferentes tiempos: 1 y 15 minutos y por 1, 2, 4 y 20 horas a 37°C en atmósfera húmeda y al 5% de CO₂. En paralelo se incubaron 6 cajas en las mismas condiciones antes mencionadas, pero a éstas no se les adicionaron partículas de

hierro y se consideraron como control negativo de cada tiempo. Una vez concluido cada uno de estos periodos de incubación, se colectó el sobrenadante correspondiente y para eliminar las partículas de hierro, cada medio condicionado se filtró empleando membranas con poros de 0.22 μm de diámetro (Millipore, Corp., Bradford, USA). Posteriormente los medios condicionados, se congelaron (-70°C) hasta su uso para la detección de PDGF mediante un ensayo inmunoenzimático. Los macrófagos de la monocapa celular se emplearon para extraer RNA total e identificar la expresión de los genes que codifican para las cadenas polipeptídicas A y B del PDGF.

INMUNOENSAYO ENZIMATICO (EIA) PARA IDENTIFICACION DE PDGF

Los sobrenadantes colectados al término de los diferentes periodos de incubación, en presencia o ausencia de partículas de hierro carbonilo, y que contenian los productos de secreción de los macrófagos, se emplearon para la cuantificación de PDGF. Primeramente el sobrenadante se concentró aproximadamente 100 veces, empleando un aparato de ultrafiltración (Amicon, Danvers, MA, USA) y membranas YM-5 con poros de retención de proteína de ≥ 5000 Da. Posteriormente se realizó el EIA tal como se reporta por Kumar en 1988. Antes de iniciar el experimento, las muestras fueron acidificadas durante 1 hora con ácido acético 1M a temperatura ambiente, tiempo después del cual, fueron neutralizadas con Tris 1M.

Esta prueba se basa en el uso de un suero anti-PDGF de origen humano, que permite la identificación de PDGF-BB/AB. La realización de esta prueba es posible, gracias a que el PDGF secretado por los macrófagos de rata, comparte determinantes antigénicas con su homólogo de origen humano. Brevemente, la prueba se realiza mezclando 60 μl de PDGF humano (estándares de 0.25 a 32 ng/ml) o bien, de medio condicionado concentrado (obtenido en presencia o ausencia de partículas de hierro carbonilo a los diferentes tiempos de incubación), con 80 μl del anticuerpo policlonal anti-PDGF humano, obtenido en cabra (1:500, Collaborative Research, Lexington, MA, USA), a microplacas de cultivo previamente cubiertas con una fracción cruda de una mezcla de las diferentes formas estructurales del PDGF de plaquetas (4 ng/ml, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante, la placa se lavó con solución amortiguadora de fosfatos adicionada con Tween 20 (0.2%, Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA) y se agregó el anticuerpo secundario, IgG obtenido en conejo contra IgG de cabra y se incubó la mezcla por 90 minutos. Este último conjugado a la isoenzima peroxidasa

(DakoPatts, Carpintería, CA, dilución 1:1000). Nuevamente se practicó un lavado a fin de eliminar el exceso de anticuerpo secundario no unido y entonces, se agregó el sustrato de la enzima peroxidasa: o-fenilendiamina (Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA), en presencia de H₂O₂ al 0.3%. El empleo de este sustrato permitió que se desarrollara color en forma inversamente proporcional a la cantidad de PDGF presente en cada muestra, éste se cuantificó espectrofotométricamente leyendo las absorbancias a 405 nm. La concentración de PDGF se calculó a partir de la curva estándar. Se trabajó con triplicados de cada una de las muestras (problema o control).

ANÁLISIS DE NORTHERN Y DOT BLOT

La identificación de la expresión de los genes que codifican para las cadenas polipeptídicas A y B del PDGF se realizó empleando el RNA total extraído de los macrófagos alveolares de rata, activados o no *in vitro* por partículas de hierro carbonilo a diferentes tiempos. La monocapa de macrófagos alveolares fué lisada con una mezcla de isotiocianato de guanidina 4M - sarcosil al 20% (Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA) y el RNA total fué extraído por el método del cloruro de litio (Sigma Chemical Co. St. Louis MO., USA), descrito previamente por Chomczynski en 1987. Para eliminar las partículas de hierro carbonilo, el lisado celular colectado en hielo con la ayuda de un gendarme de teflón, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y a 4°C., inmediatamente después las muestras se congelaron a -70°C hasta iniciar el siguiente procedimiento.

Una vez extraído el RNA de los diferentes cultivos celulares, se cuantificaron y se verificaron sus purezas. A fin de estandarizar las condiciones de hibridación con las sondas de DNAC de PDGF-A (1300 pb, amablemente donada por la Dra. Christine Betsholtz, Department of Pathology, University of Upsala, Suiza) y PDGF-B, sonda pSM1 de 1200 pb. (ATCC, Rockville, MA, USA), se realizó un dot blotting con dos diluciones de 5 y 2.5 µg de RNA total de cada muestra.

Posteriormente 30 µg de RNA total proveniente de cada muestra de macrófagos expuestos o no a las partículas de hierro carbonilo fueron sometidos a electroforesis empleando geles de agarosa al 1.2% (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), y formaldehído 2.2 M. En cada electroforesis se empleó un control positivo de expresión de PDGF: 30 µg de RNA total proveniente de la línea celular de osteosarcoma humano (U2-OS, ATCC, Rockville, MD, USA) que expresa ambas cadenas polipeptídicas del PDGF, y un marcador de PM de

RNA (RNA Ladder, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA). La integridad del RNA se verificó tificando los geles con bromuro de etidio y verificando la presencia de los RNA ribosomales 28S y 18S.

El RNA, se transfirió por capilaridad (SSC 10X) a una membrana de nylon-nitrocelulosa (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), y fué fijado a la misma homeándola al vacío a 80°C durante 1 hora. Posteriormente se procedió a prehibridar la membrana, durante 12 horas a 50°C en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, adicionada con SSC 6X, solución de Denhardt's 5X, 0.1% de SDS y 100 µg de esperma de salmón desnaturalizado. Las membranas fueron hibridadas durante 4 horas a la misma temperatura y en presencia de la misma solución amortiguadora pero ahora, adicionada con la sonda de DNAC para PDGF - A ó PDGF - B, marcadas con una actividad específica de 5×10^6 cpm/ml. Las sondas se marcaron empleando un kit de random primer (Amersham, Aylesbury, UK) y α -³²P-DCTP.

Una vez transcurrido el tiempo de la hibndación, las membranas se lavaron a 65°C por 5 minutos en SSC 2.5X - SDS 0.1%, después se practicaron 3 lavados en SSC 1.5X - SDS 0.1% a 50°C cada uno por 20 minutos. Finalmente la membrana se lavó tres veces en SSC 0.5X - SDS 0.1% a temperatura ambiente por 5 minutos. La señal autorradiográfica del DNAC marcado unido a su RNAm correspondiente, se visualizó exponiendo la membrana a una placa de rayos X (X-OMAT, KODAK, México) de 3 a 5 días. Como control de que la cantidad de RNA que fué añadida a cada camil fué la misma, las membranas también se hibridaron en presencia de la sonda de DNAC del gen que codifica para la histona H₄ (530 pb, ATCC, Rockville, MD., USA). La señales autorradiográficas obtenidas en los análisis de Northern blot, se evaluaron densitométricamente para determinar tendencias más específicas de expresión génica.

QUIMIOTAXIS

Se trabajó con el mismo método descrito en el capítulo anterior. En este caso las membranas de policarbonato, con poros de 8 µm de diámetro (Poretics Co., Livermore, CA., USA), se cubrieron previamente con gelatina tipo A (Bloom 275, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ.) al 0.07%. Se empleó PDGF-AA (Collaborative Research, Bedford, MA), PDGF-AB (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) y PDGF-BB (Collaborative Research, Bedford, MA) todos ellos recombinantes, en concentraciones de 0.125 a 64 ng/ml. Se realizaron estudios de quimiotaxis y quimioquinesis para corroborar que la respuesta observada era realmente quimiotaxis.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

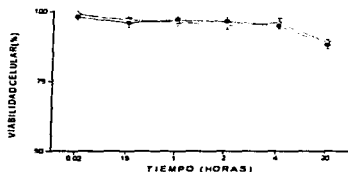
Los resultados se expresan como promedios y desviaciones estándar y las diferencias estadísticas entre los diferentes puntos, se determinaron empleando la prueba de t de Student. Un valor de $p < 0.05$ fué considerado como significativo.

II. RESULTADOS

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PDGF.

1) INDUCCION DE LA EXPRESION Y SECRECION DE PDGF EN MA POR PARTICULAS INORGANICAS VIABILIDAD CELULAR

Para verificar que las partículas de hierro carbonilo no afectaran significativamente la viabilidad de los macrófagos en cultivo, se realizaron en papaleto dos ensayos de viabilidad. Los tiempos de evaluación de viabilidad, fueron los mismos del experimento original: 1 y 15 minutos y 1, 2, 4 y 20 horas. Esto permitió atribuir directamente al hierro los cambios observados en la expresión génica del PDGF (A y B) y en su secreción, descartando el efecto inducido por la muerte de los macrófagos en cultivo, cuyo tiempo de vida media en cultivo es ligeramente mayor de 24 horas.

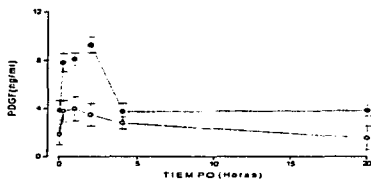


En la figura se muestra la viabilidad celular evaluada por el método de MTT. Los círculos abiertos (○) representan la viabilidad de los cultivos de macrófagos que no fueron expuestos a partículas y los círculos cerrados (●) aquellos expuestos a partículas de hierro carbonilo. Como puede verse en la figura, la viabilidad celular no varió significativamente durante el período del experimento. Después

de 20 horas, la viabilidad decreció en un 12%, sin embargo, se observó la misma tendencia entre las células expuestas o no a partículas de hierro carbonilo. El mismo resultado se observó en el experimento en el que se evaluó la viabilidad celular cuantificando la enzima DHL (los resultados no se muestran).

SECRECION DE PDGF A DIFERENTES TIEMPOS

Se cuantificó la concentración de PDGF-BB/AB (por el método de EIA descrito en métodos), presente en los medios condicionados de los macrófagos expuestos y no expuestos a partículas de hierro carbonilo a los diferentes tiempos del experimento.



La figura muestra que las partículas de hierro carbonilo, indujeron en los MA un incremento en la secreción de PDGF al medio (círculos cerrados, ●). La mayor concentración de PDGF al medio, se observó entre los primeros 15 minutos y las 2 horas de exposición a las partículas, alcanzando un máximo de 9.2 ng/ml, después de 2 horas de exposición. La concentración de PDGF-BB/AB disminuyó

bruscamente después de 4 h hasta alcanzar aproximadamente 4 ng/ml, concentración que se mantuvo constante hasta el fin del experimento (20 h). Los macrófagos no expuestos a partículas (círculos abiertos, ○), mostraron una tendencia semejante a la observada en aquéllos expuestos a hierro carbonilo, es decir, se observó un pico de secreción de PDGF a la hora del experimento. Sin embargo, éstos últimos secretaron PDGF en una concentración máxima de sólo 4 ng/ml. Las diferencias entre los macrófagos expuestos a las partículas de hierro y las no expuestas durante la primera y segunda hora son significativas ($p < 0.05$).

II) EXPRESION GENICA DE PDGF (A Y B) A DIFERENTES TIEMPOS

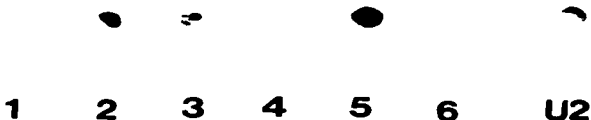
Como se mencionó en la sección de métodos, a fin de estandarizar las condiciones de hibridación, primero se realizaron pruebas de dot blot para las sondas de DNAC de PDGF-B y PDGF-A. Se hibridaron 2.5 µg RNA total de las diferentes muestras de macrófagos expuestos y no expuestos (no se muestran resultados) a partículas de hierro carbonilo, a los seis diferentes tiempos de incubación. Se emplearon 2.5 µg RNA total obtenido de la línea celular U2-OS como control positivo.

ANALISIS DE DOT BLOT

1 PDGF-B



2 PDGF-A



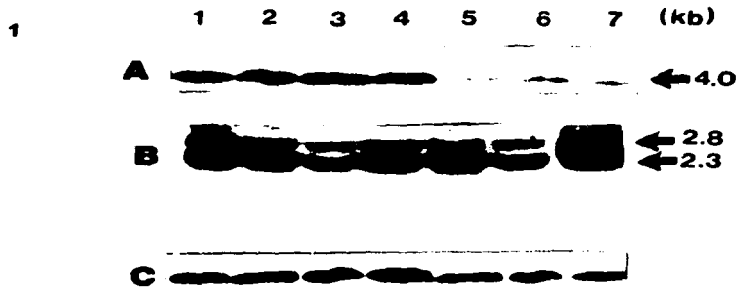
1 2 3 4 5 6 U2

Como se observa en las figuras 1 y 2, a partir del dot blot, se deduce que las partículas de hierro carbonilo indujeron la expresión del PDGF B (1) y A (2) respectivamente en macrófagos alveolares expuestos a partículas inorgánicas a diferentes tiempos (1: 1 minuto, 2: 15 minutos, 3: 1 hora, 4: 2 horas, 5: 4 horas, 6: 20 horas). Así mismo, se corroboró la expresión de ambos genes del PDGF en la línea U2-OS a de RNA total 2.5 μ g (control positivo). La expresión de cada una de las cadenas del PDGF fué diferente; la expresión de PDGF B se indujo inmediatamente después de la exposición de los macrófagos alveolares a las partículas de hierro carbonilo, dicha expresión fue disminuyendo con el tiempo.

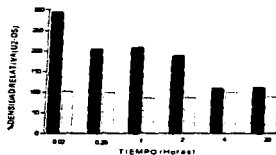
En cambio, como se muestra en la figura 2, la expresión de PDGF A mostró un aumento en su expresión hasta después de los primeros 15 minutos de exposición a las partículas de hierro carbonilo, observándose un máximo de expresión a las 4 horas de exposición de las células a las partículas. Las diluciones de RNA total de 2.5 μ g fueron demasiado pequeñas para permitir observar la expresión génica claramente.

ANÁLISIS DE NORTHERN BLOT

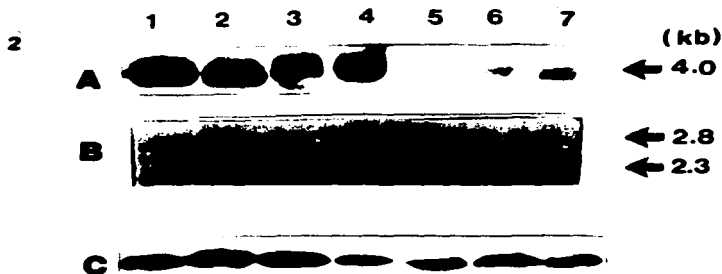
Una vez estandarizadas las condiciones de hibridación, se procedió a realizar el análisis de Northern blot correspondientes.



En la figura 1, se muestra la expresión de los genes del PDGF-B (panel A) y A (panel B) en macrófagos alveolares no expuestos a partículas inorgánicas a través del tiempo (1: 15 minutos, 2: 1 hora, 3: 2 horas, 4: 4 horas, 5: 20 horas). Se observó una expresión constitutiva de ambos genes del PDGF. Se evaluó por densitometría la expresión de estos genes, y se corrigieron estos valores de expresión en función de la expresión del gene de la histona H4 (panel C) y en relación a la expresión del control positivo (línea número 7, U2-OS).



Después de las correcciones que consideraron la cantidad de RNA adicionada en los gels y su relación con la expresión génica del control positivo (U2-OS), se observa que PDGF-B (barras cerradas) se expresa desde el inicio del experimento y esta expresión decae con el tiempo. La expresión del PDGF-A en cambio (barras abiertas), no presentó ninguna modificación significativa a lo largo de las 20 horas de duración del experimento.



En la figura 2 se muestra la expresión de los genes del PDGF-B (panel A) y PDGF-A (panel B) y del gene que codifica para la histona H4 (panel C) en RNA total obtenido de macrófagos alveolares expuestos a partículas de hierro carbonilo, a diferentes tiempos (1: 1 minuto, 2: 15 minutos, 3: 1 hora, 4: 2 horas, 5: 4 horas, 6: 20 horas). También se muestra la expresión de los genes del PDGF A (panel B) y del PDGF B (A) en la línea celular U2-OS, (control positivo, línea número 7).

Se observaron las mismas tendencias antes descritas en el análisis por dot blot. Las partículas de hierro indujeron un aumento en la expresión de los genes de PDGF A y B en macrófagos alveolares. Se confirmó que la expresión de ambos genes sucede a diferentes tiempos. El máximo de la expresión del PDGF-B, se observó después de 1 minuto de exposición de los macrófagos a las partículas. Se detectó claramente un transcrito de 4 kb (panel A), cuya expresión fué decreciendo en el tiempo. Para el gene del PDGF-A se detectaron 2 transcritos de 2.3 y 2.8 kb respectivamente. Estos se expresaron inicialmente hasta después de una hora de exposición de los macrófagos a las partículas y mostraron una expresión máxima después de 4 horas.

En el panel C se observa que no hubo diferencias significativas en la cantidad de RNA total adicionada en los geles, sin embargo, a fin de considerar las pequeñas diferencias que pudiera haber habido, las placas de rayos X se sometieron a un estudio densitométrico y los valores relativos de la expresión génica de los genes del PDGF se corrigieron en función de los valores de la expresión de H4.



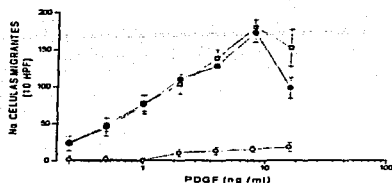
Aun corrigiendo los valores de la expresión génica de PDGF con la expresión de H4 y considerando la expresión de PDGF en relación a la observada en el control positivo (U2-OS), se observaron las mismas tendencias antes mencionadas para el análisis por dot blot. El PDGF-B (barras cerradas) se expresa desde el primer minuto de exposición de los macrófagos alveolares a hierro carbonilo y dicha expresión, se

mantiene hasta las 2 horas, observándose después una disminución de la misma. En cambio la expresión de PDGF A (barras abiertas) se incrementó ligeramente hasta después de dos horas de exposición y se mantuvo alta hasta las 4 horas, luego inició el decremento.

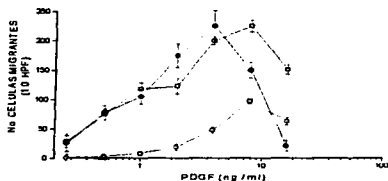
Al comparar los valores de la expresión relativa del gene que codifica para la cadena A y B del PDGF, obtenidos en macrófagos alveolares expuestos a partículas inorgánicas y los no expuestos, se observó que el hierro carbonilo indujo un aumento en la expresión relativa del PDGF-B hasta 2.2 veces mayor. Este incremento disminuyó con el tiempo del experimento hasta llegar a un valor de incremento en la expresión 0.9 veces mayor que el observado en los MA no expuestos a partículas. En cuanto a la expresión relativa del gene que codifica para la cadena polipeptídica del PDGF-A en MA expuestos y no expuestos a partículas de hierro carbonilo, se observó una estimulación de la expresión del gene A del PDGF de solamente 0.5 veces mayor en los MA expuestos a partículas.

III) QUIMIOTAXIS INDUCIDA POR PDGF (AA, AB Y BB) EN FIBROBLASTOS

A fin de determinar si cada una de las formas estructurales del PDGF, induce un efecto biológico diferente en fibroblastos de pulmón de rata, se realizaron estudios de quimiotaxis en las que se probaron curvas dosis-respuesta, empleando cada una de los dímeros del PDGF (AA, AB y BB). Como control positivo se trabajó con la línea celular Swiss 3T3 cuya respuesta quimiotáctica al PDGF es bien conocida y en el que se ha determinado el número de receptores de membrana α y β que posee. Cada uno de estos receptores, posee una diferente afinidad para los dímeros PDGF (Bonner, 1993).



activad quimiotáctica, para ambos dímeros PDGF-BB y AB a los 8 ng/ml.



AA, con una respuesta máxima a 8 ng/ml (98 células/10 HPF). Sin embargo, ésta respuesta claramente fué menor, que la inducida por PDGF-BB (228 células/10 HPF) y PDGF-AB (225 células/10 HPF) quienes indujeron una respuesta máxima a los 4 y 8 ng/ml respectivamente.

RESUMEN DE RESULTADOS

1. Cada una de las diferentes formas estructurales del PDGF, induce un efecto diferente en la quimiotaxis de fibroblastos de pulmón de rata.
2. Las partículas de hierro carbonilo, inducen la expresión y secreción de PDGF en macrófagos alveolares.

3. Los genes de PDGF A y B se expresan en forma diferente en el tiempo. El gene que codifica para la cadena B del PDGF, se expresa inmediatamente después de la exposición de los macrófagos a las partículas inorgánicas. El gene que codifica para la cadena A del PDGF, se expresa hasta después de una hora encontrándose el máximo a las 4 horas.

4. La secreción de PDGF inducida al medio por las partículas inorgánicas presenta un pico máximo de secreción (9.2 ng/ml) a las 2 horas.

CAPITULO 6

DISCUSION

MODULACION DE LA RESPUESTA FIBROBLASTICA INDUCIDA POR TROMBINA

Se ha demostrado que la α -trombina, además de ser un componente clave de la cascada de la coagulación (Fenton, 1993), es *in vitro*, un potente agente mitogénico y quimioatrayente para fibroblastos de pulmón (Gray, 1990, Bar-Shavit, 1992, Dawes, 1993). Por lo que uno de los objetivos del presente estudio, fué el determinar la importancia de esta proteasa de serina en la respuesta fibroblástica, y establecer sus posibles repercusiones, en patologías específicas como la fibrosis pulmonar.

Buscando establecer un nexo entre la posible respuesta inducida por la trombina, en la actividad fibroblástica *in vitro* y su posible participación en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, se consideró el hecho de que LBA de pacientes con fibrosis pulmonar, poseen la capacidad de inducir un incremento en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano (Cambrey, 1992). Este aumento en la proliferación fibroblástica se ha atribuido, a la presencia de mediadores polipeptídicos como la ET-1 (Cambrey, 1992), el IGF-1 (Harrison, 1995), el PDGF (Martinet, 1986, Antoniades, 1990) y el TGF β 1 (Moreland, 1992).

Tomando en cuenta los antecedentes antes mencionados y el hecho de que en trabajos previos se ha determinado que dichos eventos de proliferación y quimioatracción fibroblástica (como los inducidos *in vitro* por la trombina), son clave en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, se intentó demostrar la presencia de trombina en LBA de pacientes con diferentes tipos de fibrosis y establecer la contribución específica de la trombina, presente en los LBA, a la proliferación fibroblástica. Una vez confirmada la presencia de trombina en LBA de pacientes con ES y determinada su contribución al incremento de la proliferación fibroblástica, se intentó identificar la posible modulación inducida por la trombina en el metabolismo de la colágena. Se verificó si dicha modulación se regulaba a nivel de expresión génica, al menos para la procólágena $\alpha(1)$ 1.

DETERMINACION DE TROMBINA EN LBA DE PACIENTES CON FIBROSIS

En el presente trabajo se encontró que la α -trombina estaba presente en muestras de LBA de pacientes con ES. La concentración de trombina determinada en estas muestras fué aproximadamente 3.5 veces mayor que la concentración de trombina encontrada en muestras de LBA de pacientes con otros tipos de fibrosis pulmonar (FPI y sarcoidosis), y en los LBA de los voluntarios sanos. Estos resultados concuerdan con un reporte previo (Ohba, 1994), en el que se determinó trombina en LBA de pacientes con ES en concentraciones hasta 14 veces

mayores a las observadas en los controles, sin embargo, en este reporte, se atribuye el efecto mitogénico inducido por los LBA en fibroblastos de pulmón humano al PDGF inducido por la trombina.

Una de las características de algunos padecimientos fibróticos pulmonares, es el incremento en la permeabilidad microvascular asociada a lesión celular endotelial, que permite el flujo de mediadores polipeptídicos, como la trombina, desde la circulación al pulmón (Crystal, 1984), esto hace suponer que se podría encontrar a esta proteasa de serina en las muestras de LBA de cualquier paciente con fibrosis. Cabe destacar que en la fibrosis pulmonar asociada a ES, la lesión vascular es más importante que en otras fibrosis (LeRoy, 1988). Hecho que se comprobó con los resultados del presente trabajo, en los que la trombina se encontró en concentraciones elevadas, exclusivamente en LBA de estos pacientes y no en LBA de pacientes con otros tipos de fibrosis como FPI y sarcoidosis. Cabe destacar que aunque la albúmina se ha usado clásicamente como marcador de permeabilidad a pulmón (Van Vyve, 1995), en este caso no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de albúmina presentes en las muestras de LBA de pacientes o de los voluntarios sanos. Esto podría explicarse si la lesión pulmonar permitiera una permeabilidad de moléculas con peso molecular inferior a la albúmina.

Debido a que se ha postulado que la mayoría de los padecimientos fibróticos, poseen mecanismos similares durante su patogénesis (Crystal, 1981, Laurent, 1988, Elias, 1985, Richards, 1991, Harrison, 1990, Harrison, 1991), resulta relevante el hallazgo demostrado con la realización del presente trabajo, en que se estableció una diferencia clara entre la fibrosis pulmonar asociada a ES y otros tipos de fibrosis (concentración elevada de trombina solo en LBA de pacientes con ES). Cabe mencionar que al considerar el tiempo de desarrollo de la enfermedad en los pacientes con ES, de quienes se obtuvieron las muestras, la presencia de trombina en concentración elevada, podría asociarse a fases tempranas de la patogénesis de este tipo de padecimientos. Esto además, sugiere la existencia de mecanismos, aparentemente selectivos, para la fibrosis pulmonar asociada a ES.

Cabe mencionar que aunque en los diferentes tipos de fibrosis pulmonar se postula la existencia de lesiones a nivel pulmonar, sólo en la fibrosis pulmonar asociada a esclerosis sistémica, se ha documentado ampliamente la presencia de lesión vascular como mecanismo primario en la patogenia de este padecimiento (LeRoy, 1975). En estos pacientes además se ha demostrado la evidencia de lesión celular endotelial asociada a inflamación, disrupción de

las células endoteliales (Fleischmajer, 1977) y la presencia de un infiltrado perivascular (Fleischmajer, 1990).

Una vez determinada la presencia de trombina en altas concentraciones, sólo en muestras de LBA de pacientes con ES, se intentó confirmar su presencia en éstos LBA por inmunodetección (Western blotting). Sólo se encontró la banda que correspondiera al peso molecular de la trombina pura, en la de la muestra de LBA del paciente con ES, en que se cuantificó la mayor concentración de trombina (32×10^{-8} M). Sin embargo, el anticuerpo anti-trombina empleado se unió a una proteína de peso molecular de aproximadamente 170 a 180 KDa, y a otra de peso molecular > 200 KDa, lo que podría explicarse si la trombina no se encontrara en forma libre. Al respecto cabe mencionar que en reportes previos, en los que se ha intentado identificar trombina el mismo método, sólo se encontró una banda de 93 KDa, misma que los autores argumentan, es resultado de la combinación de trombina (37 KDa) y su inhibidor natural, la antitrombina III (58 KDa) (Bar-Shavit, 1992).

Sin embargo, en este caso se observaron bandas con un peso molecular mayor. Ninguna de éstas corresponde a protrombina ya que dicho precursor posee un peso molecular de sólo 72 KDa, pero sí podría especularse al respecto de que estas bandas correspondieran a trombina conjugada con el inhibidor natural de proteasas la α -2-macroglobulina al que la trombina se une avidamente (Léránt, 1990), y al complejo de protrombinasa para las bandas 176 KDa (Bonner, 1995).

PROLIFERACION FIBROBLASTICA

El ensayo colorimétrico, basado en el uso del colorante azul de metileno, que se empleo para la evaluación de la proliferación fibroblástica durante el desarrollo del presente trabajo, es un sistema *in vitro*, que permite determinar el efecto de factores de crecimiento puros o presentes en fluidos biológicos, en la proliferación de dichas células. Una de las ventajas del sistema, es que permite observar directamente el efecto del factor a prueba en las células. Los ensayos convencionales empleados para la determinación de la proliferación celular, se basan en el uso de isótopos radioactivos y evalúan la incorporación de timidina tritiada, sin embargo, éstos asumen que la cantidad de precursor radioactivo adicionado al cultivo celular en división será empleado en su totalidad, son largos y llevan implícito el riesgo del trabajo con material radioactivo. En cambio el método del azul de metileno, es rápido, evita el uso de material radioactivo y permite la confirmación de los resultados por cuenta directa (Oliver, 1989). Cabe mencionar que en este estudio en particular, se estandarizaron las

condiciones de trabajo (baja concentración de suero), de tal manera que la evaluación de la proliferación fibroblástica, pudiera ser atribuible exclusivamente al factor de crecimiento en prueba, descartando la contribución hecha por el suero presente en el medio de cultivo ya que fué imposible trabajar en ausencia del mismo.

Aunque el ensayo colorimétrico desarrollado en placas de 96 pozos, permite la determinación rápida de la actividad de dichos factores de crecimiento, debo mencionar que existen algunos problemas inherentes al sistema. Este implica el uso de cultivos celulares establecidos, y posee la desventaja de que la respuesta observada en los primeros pases, disminuirá con el aumento en el número de los mismos. Por otro lado, el empleo de anticuerpos neutralizantes de actividad biológica en el sistema, si bien hacen al ensayo muy específico, pueden llegar a inducir una sobre estimación del efecto de la citocina en estudio. Otra limitante del sistema incluye el que no es posible considerar la detección de actividad biológica latente (potencialmente activable durante el desarrollo del ensayo), o bien parcialmente activa (moléculas precursoras) presente en el sistema. Es importante tener en consideración las limitantes del sistema que se empleó durante el desarrollo de la presente tesis, a fin de determinar objetivamente los alcances y limitaciones de las observaciones realizadas.

En este trabajo se demostró, que todas las muestras de LBA de pacientes con diferentes tipos de fibrosis pulmonar (ES, FPI, sarcoidosis), indujeron *in vitro* un incremento en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano, en contraste con los LBA de voluntarios sanos que sólo indujeron una estimulación fibroblástica no significativa con respecto a la observada en el medio control. Cabe destacar que los LBA de pacientes con ES, indujeron un incremento en la proliferación fibroblástica dosis dependiente de la dilución del LBA, mientras que las otras muestras de LBA no disminuyeron significativamente el incremento en la proliferación fibroblástica con la dilución de la muestra. Estos resultados son congruentes con observaciones previas, en las que se ha determinado un efecto dosis-respuesta inducido por muestras de LBA de pacientes con ES (Harrison, 1994, Cambrey 1992, Mattoli, 1991), y sugieren que el balance neto de factores de crecimiento presente en las muestras de LBA probadas, favoreció la activación de los fibroblastos a proliferar.

Este balance positivo a la proliferación podría explicarse, por la existencia de un exceso de mediadores estimuladores de la proliferación fibroblástica o bien, debido a la ausencia de mediadores de la inhibición de la misma. En el caso específico de los LBA de pacientes con

ES, se encontró una concentración muy elevada de trombina presente en éstos. La adición de inhibidores específicos de trombina (hirudin y PPACK, Kettner, 1979, Fenton, 1991) al sistema, permitieron atribuir a esta proteasa de serina, aproximadamente el 60% de la estimulación de la proliferación fibroblástica inducida por los LBA. Cabe mencionar que no pudo empujarse ATIII, pese a que éste hubiera sido un control deseable a probar en el sistema, al representar el inhibidor natural de la trombina (Fenton, 1993), debido a que su presentación comercial contiene Tris, en concentración aparentemente tóxica para los fibroblastos IMR. Esto se dedujo a partir de experimentos, en los que se evaluó el efecto del Tris solo, y se encontró que éste, aún en dosis bajas, inducía el desprendimiento de las células de las placas del cultivo imposibilitando la realización del ensayo 90 (estos resultados, no se muestran).

Por otro lado es importante mencionar, que se estableció una buena correlación de los resultados, al observar que solo en aquellas muestras de LBA en las que se pudo determinar trombina en altas concentraciones, fué posible inhibir la actividad proliferativa inducida por las mismas, empleando inhibidores específicos de la trombina, esto permitió establecer la contribución específica de la trombina, presente en las muestras de LBA de pacientes con ES a la proliferación fibroblástica. Además, se estableció una muy buena correlación, entre los niveles de trombina presentes en las muestras de LBA de pacientes con ES y la proliferación fibroblástica inducida por las mismas, especialmente si se considera que sólo se contaba con un número reducido de muestras (10). Si bien esto no es determinante en el establecimiento de la contribución de trombina a la modulación de esta actividad fibroblástica, sugiere fuertemente su participación, no sólo en este tipo de modulación, sino que además sugiere su implicación en la patogénesis de la fibrosis pulmonar asociada a esclerosis sistémica.

En las demás muestras de LBA (de pacientes con FPI y sarcoidosis), en las que no pudo detectarse trombina; pero si se observó un incremento en la proliferación fibroblástica dosis independiente de la dilución de LBA, se especuló al respecto de que la proliferación fibroblástica inducida por éstas muestras, podría atribuirse a la gran cantidad de factores de crecimiento presentes en los LBA o bien, que con la dilución de las muestras, se permitió la activación de factores de crecimiento cuyo efecto estaba enmascarado a dosis altas, por otros factores, o bien que a altas concentraciones de LBA, actuarán los inhibidores de factores de crecimiento, posiblemente presentes en las muestras. Estudios similares han detectado una actividad proliferativa incrementada, inducida por LBA de pacientes con FPI, sin embargo, en éstos no se ha hecho ningún intento por caracterizarlos (Cantín, 1988). En algunos otros, se

ha determinado la presencia de PDGF (Martinet, 1987, Antoniadis, 1990), TGF β (Laurent, 1993) e IGF-1 (Harrison, 1995, Cambrey, 1992).

Considerando el planteamiento anterior, se intentó determinar la presencia de otros factores de crecimiento en los LBA de pacientes con fibrosis que explicará el 40% de la actividad fibroblástica no atribuible a trombina e inducida por los LBA de pacientes con ES y la actividad de la actividad fibroblástica inducida por los LBA de pacientes con FPI y sarcoidosis y que no pudo ser atribuida a trombina. Se emplearon anticuerpos bloqueadores de actividad biológica contra PDGF, TGF β e IGF-1. Solo se detectó una disminución de la estimulación de la proliferación fibroblástica en muestras de pacientes con sarcoidosis en presencia de anticuerpos anti-PDGF. En ninguna de las otras muestras de LBA, pudo ser disminuida significativamente la proliferación celular inducida por los LBA por los anticuerpos bloqueadores de actividad biológica. Este hecho contrasta con reportes previos en los que, como se mencionó anteriormente, se ha determinado la presencia de PDGF en modelos animales de fibrosis y en LBA de pacientes con FPI (Fine, 1991, Martinet, 1986) y la presencia de IGF-1 en LBA de pacientes con ES (Harrison, 1995, Cambrey, 1992).

Esto solo puede ser atribuible a que en las muestras particulares en estudio, dichos factores de crecimiento no estuvieran presentes, o bien a que éstos se presentarán sólo en estadíos clínicos diferentes a los estudiados previamente. Además debe considerarse, que para el caso específico de algunas formas estructurales del PDGF, el TGF β , y el IGF-1, éstos no hubieran podido ser detectados, si éstos se hubieran encontrado unidos a la α -2-macroglobulina (Huang, 1983, Bonner, 1992, Bonner, 1995, Webb, 1992, Danielpour, 1990) ya que, las muestras no se sometieron a ningún tratamiento ácido, para liberarlos de la α -2-macroglobulina. En el caso del IGF-1 puede mencionarse que las diferentes preparaciones de anti-IGF-1 no son siempre homogéneas, y además frecuentemente están contaminadas con formas que no poseen la estructura tridimensional correcta (Atkinson, 1980), lo que podría explicar el no haber detectado IGF-1, al menos en las muestras de LBA de pacientes con ES.

En cuanto a la naturaleza y posibles fuentes de los factores de crecimiento presentes en el líquido que recubre a la superficie pulmonar en pacientes con fibrosis, es importante discutir algunos puntos relativos a la celularidad y los niveles de albúmina encontrados en los LBA, que ayudarán en buena medida, a la interpretación de los resultados. En este estudio se empleó un procedimiento estandarizado para la realización de los LBA y no se encontró

ninguna diferencia significativa en el porcentaje de recuperación de LBA de pacientes con fibrosis o de los voluntarios normales. Cabe mencionar que los LBA proveen de información adicional acerca de la patología pulmonar (Wallaert, 1986, Hamison, 1991), ya que refleja la actividad secretora del pulmón, funciones celulares tales como producción de anticuerpos y eventos anormales como inflamación y formación de complejos inmunes en el pulmón (Haslam, 1980).

La dilución variable del fluido que recubre al epitelio pulmonar durante el procedimiento de lavado, hace necesario encontrar un método para determinar este factor de dilución con objeto de estandarizar la determinación de los elementos proteínicos y celulares. La albúmina es una importante proteína plasmática, la cual no es sintetizada en los pulmones, ni se conoce ningún mecanismo de transporte especial que le permita cruzar la barrera capilar alveolar. Esta proteína ha sido ampliamente usada como marcador de permeabilidad de la membrana *in vivo*. Aunque algunos otros han sido empleados (urea, calcio, potasio), el de mayor difusión es la albúmina con la única desventaja de que los niveles de este marcador pueden ser mal interpretados por contaminación sanguínea. Se sabe que las concentraciones de proteínas plasmáticas presentes en LBA de voluntarios sanos, cuando se expresan como un porcentaje de la proteína total, en general se parecen mucho a la concentración presente en suero. Excepciones a esta regla lo constituyen los IgG, IgA y la transferrina, que se encuentran en concentraciones mucho más elevadas, lo que sugiere producción local. Por otro lado, se sabe que proteínas de alto peso molecular >300kDa como la α -2 macroglobulina, que se encuentran en muy baja concentración en las muestras de LBA, comparando con las concentraciones séricas, sugiere que la barrera capilar alveolar es impermeable a moléculas de alto PM.

Estas observaciones apoyan la hipótesis de que una mayor permeabilidad de la barrera epitelial/endotelial, existe en el desarrollo temprano de la enfermedad pulmonar, y por lo visto, persiste durante el desarrollo de la misma. Esto a su vez refuerza la hipótesis de que mediadores polipeptídicos provenientes de la circulación (como la trombina), junto con la albúmina entre al pulmón y actúen sobre los fibroblastos. Algunas observaciones experimentales que confirman esta hipótesis, corresponden a estudios en los que se ha observado que en presencia de epitelio capilar lesionado, como el que se presenta en pacientes con ES, hay edema pulmonar (Hamison, 1991). También existe alguna evidencia experimental que confirma esta hipótesis obtenida en modelos de fibrosis pulmonar en animales; en éstos se ha detectado el goteo de proteínas por las lesiones vasculares varios

días antes de que la fibrosis pulmonar se haga aparente y detectable por técnicas bioquímicas e histológicas.

Es importante destacar, que no se sabe en que proporción el fluido que recubre al epitelio pulmonar, refleje lo que sucede en el microambiente de los fibroblastos presentes en el intersticio pulmonar de los pacientes con ES, FPI o sarcoidosis, sin embargo, existe alguna evidencia morfológica de lesiones celulares a nivel epitelial del tipo I, en la que se ha caracterizado el estado de las membranas basales en estados tempranos de enfermedad fibrótica asociada a ES (Harrison, 1991). De acuerdo con estos estudios, si es posible que mediadores atraviesen de la vasculatura del intersticio pulmonar al fluido que recubre la superficie pulmonar y viceversa. Estos mismos resultados se han confirmado en algunos modelos experimentales de asbestosis (Rom, 1991), ambos hallazgos confirman las hipótesis antes planteadas.

TROMBINA COMO MODULADORA DEL METABOLISMO DE COLAGENA

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permitieron demostrar que la trombina, selectivamente incrementa la producción de procolágena. Este hecho es relevante ya que nunca antes se había reportado a esta proteasa de serina, como moduladora del metabolismo de colágena. Considerando que la trombina está presente en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar asociada a ES y que puede mediar la proliferación (Gray, 1992, Bar-Shavit, 1992) y quimioatracción de fibroblastos pulmonares (Dawes, 1993), se deduce que la trombina está involucrada a diversos niveles en la patogénesis de la enfermedad fibrótica pulmonar asociada a ES. La adición del inhibidor específico de la trombina hirudin, al sistema de evaluación del metabolismo de la colágena, permitió atribuir a esta proteasa de serina, el incremento neto en la producción y el decremento en la degradación de procolágena en los fibroblastos de pulmón humano HLF-1.

Una proporción del incremento neto en la síntesis de procolágena inducido por la trombina, podría atribuirse a una disminución en la proporción de procolágena degradada intracelularmente. Aunque este tipo de mecanismo no ha sido demostrado en fibroblastos pulmonares, sino que sólo ha sido propuesto para fibroblastos de piel (Kahaleh, 1991), podría estar funcionando también en este tipo de células. El TGF β , empleado como control positivo en el desarrollo del presente trabajo, es bien conocido como uno de los más potentes estimuladores de la síntesis de colágena y ha sido propuesto, que su mecanismo de acción está relacionado con la disminución en la proporción de procolágena degradada

intracelularmente (McAnulty, 1991). Cabe hacer notar que la trombina indujo un incremento mayor en la síntesis de procolágena (hasta un 200% más) que el inducido por el control positivo, reportado como más potente hasta ahora (Roberts, 1986, Varga, 1986). Esto aunado con los datos antes mencionados, remarca la importancia potencial de la trombina en la patogénesis de la fibrosis pulmonar.

Cabe mencionar que se realizó un estudio preliminar, en el que se evaluó el efecto del LBA de pacientes con ES en el metabolismo de colágena. Debido a los grandes volúmenes requeridos para el desarrollo de experimentos en los que se pretende evaluar el metabolismo de la colágena y a la limitada cantidad de muestra de LBA concentrado con la que se contaba, sólo se realizó el estudio en 3 muestras de LBA (con alta concentración de trombina). Las tres muestras indujeron un incremento selectivo en la producción de la procolágena, probablemente debido a un decremento en la degradación intracelular de la procolágena. La adición de hirudin (inhibidor selectivo de la trombina), a las muestras de LBA indujo una disminución en el incremento de la síntesis de la colágena inducido por los LBA. Estos resultados combinados con el hecho demostrado en el presente trabajo, de que la trombina induce la expresión génica de fibroblastos de pulmón humano, sugieren fuertemente que la trombina además del TGF β (modulador clásico del metabolismo de la colágena) contribuyen al efecto de las muestras del LBA al metabolismo de la procolágena.

Se sabe que la densidad celular del cultivo afecta el índice del metabolismo de colágena. Por lo que todos los experimentos en los que se estudió el metabolismo de la colágena se realizaron no sólo con la misma línea celular, sino con la misma densidad y se cultivaron en NCS al 5% durante 5 días hasta que alcanzaron confluencia total. Los índices de síntesis y degradación de procolágena se determinaron 24 horas después, una vez que se asumió que las células estaban en fase G₀, donde el efecto de la densidad celular es una inhibición del crecimiento celular por contacto. Las determinación de hidroxiprolina siempre se correlacionó con el número celular por determinación del contenido de DNA en la monocapa celular. La modulación ejercida por la trombina pura en el metabolismo de la colágena de fibroblastos pulmonares, no sólo se confirmó mediante el uso del inhibidor específico de la trombina: hirudin, sino que además, se evaluó la capacidad de la trombina para estimular la expresión del gen que codifica para la cadena α de la procolágena tipo I. Se encontró que la trombina era capaz de inducir una expresión incrementada de la expresión de dicho gen y que lo hacía en forma dosis dependiente.

En resumen, en este estudio se demostró que la actividad fibroblástica puede ser modulada por mediadores polipeptídicos. Específicamente se demostró que el líquido que recubre la los alveolos pulmonares de pacientes con fibrosis asociada a esclerosis sistémica, contiene trombina y que ésta induce un incremento de la proliferación fibroblástica, así como un aumento en la producción y una disminución en la degradación de colágena en fibroblastos pulmonares. Estos datos sugieren que la trombina podría ser relevante en las fases tempranas del establecimiento de esta enfermedad (Hernández-Rodríguez, 1995). Si esto puede ser demostrado, tomando en cuenta la especificidad de la trombina para la fibrosis asociada a ES ya que no está presente en muestras de LBA de otras enfermedades fibróticas (FPI y sarcoidosis), podría ser de particular trascendencia considerar a futuro a la trombina, como un marcador útil en la detección temprana de la enfermedad.

En esta sección se discutió el efecto de la trombina pura y presente en LBA de pacientes con ES como moduladora de la actividad fibroblástica (proliferación y metabolismo de la colágena), en la siguiente sección discutiré el efecto de otro factor de crecimiento más estudiado pero no menos relevante, en la patogenéesis de la fibrosis pulmonar, el TGF β .

MODULACION DE LA RESPUESTA FIBROBLASTICA INDUCIDA POR TGF β

Otro de los objetivos del presente trabajo, fué determinar el efecto de los TGF β_2 y TGF β_3 en la proliferación, quimiotáxis y metabolismo de la colágena, inducido en fibroblastos de pulmón humano y comparar su efecto con el ya reportado, por los parámetros biológicos antes mencionados, del TGF β_1 . Adicionalmente se pretendió comparar los efectos inducidos por cada una de las tres formas estructurales del TGF β antes mencionadas, a los mismos 3 niveles de actividad biológica, pero ahora en fibroblastos de pacientes con diferentes tipos de fibrosis pulmonar (FPI y ES), postulando la existencia de una regulación cuali o cuantitativa diferente, inducida en este diferente tipo de fibroblastos por TGF β y sus tres formas estructurales.

PROLIFERACION CELULAR

Aunque se ha trabajado ampliamente con la caracterización del TGF β_1 , es importante considerar que las diferentes formas estructurales del TGF β , (hasta ahora se conocen al menos 5 diferentes, Derynck, 1988), son producidas por diferentes tipos celulares y podrían estar presentes en diferentes concentraciones y subtipos, dependiendo del estado de avance

de patologías como la fibrosis pulmonar. Esto es relevante, si además se considera que cada TGF β , podría ser capaz de inducir un efecto biológico diferente,

Del TGF β , se sabe por ejemplo, que regula un gran número de funciones celulares; además de ser el más potente estimulador de la síntesis de colágena conocido. Cabe destacar que la trombina, de acuerdo a los resultados obtenidos con el desarrollo del presente trabajo, podría ser otro importante inductor de la síntesis de colágena. El TGF β además, aumenta la síntesis de fibronectina, glucosaminoglicanos, inhibe la degradación proteolítica de proteína de la matriz extracelular (McAnulty, 1995), etc. En cuanto a su efecto en la proliferación celular, se ha reportado que ejerce un efecto dual en la proliferación de fibroblastos de prepucio humano (Batergay, 1990). A concentraciones bajas induce una estimulación de la proliferación celular, mientras que a concentraciones altas induce una inhibición de la misma.

En el presente trabajo se demostró que en fibroblastos de pulmón humano normal, cada una de las tres formas estructurales del TGF β estudiadas, indujeron un efecto diferente, dependiendo de la concentración empleada y del tiempo de exposición del cultivo a dichos factores de crecimiento. Después de 24 horas de cultivo, se observó que los 3 TGF β indujeron un efecto muy similar en la proliferación de los fibroblastos de pulmón humano fetal HLF-1. Es decir, estimularon la proliferación de éstos a dosis bajas e inhibieron su proliferación a dosis altas. Estos resultados son semejantes a reportes previos, en los que se ha observado la misma tendencia inducida por TGF β , en fibroblastos de prepucio humano (Batergay, 1990). A las 48 horas de exposición del cultivo de los fibroblastos pulmonares a las diferentes formas estructurales del TGF β , aunque se observó una diferencia significativa en la estimulación e inhibición inducida por cada forma estructural del TGF β , se conservó en general, la misma tendencia de efecto en la proliferación celular: estimulación a bajas dosis e inhibición a altas dosis, para cada uno de los TGF β en estudio.

Contrariamente a lo observado a las 24 y 48 horas, después de 72 horas de cultivo, los TGF β ₁ y TGF β ₂ indujeron un efecto de inhibición de la proliferación fibroblástica a todas las dosis probadas (muy semejante entre sí). Este efecto se observó aún a dosis bajas a las que antes, se había observado una estimulación. En cambio el TGF β ₃ a dosis bajas, conservó el efecto estimulador de la proliferación fibroblástica.

El efecto inducido en la proliferación fibroblástica por cada una de las formas estructurales del TGF β , pudo ser atribuido específicamente a cada una de las diferentes formas estructurales del TGF β en estudio, gracias al empleo del anticuerpo anti-TGF β , con el que se revirtieron los efectos de inhibición observados y descritos anteriormente para cada uno de los TGF β en estudio.

Estos resultados confirman la existencia de fenómenos de regulación, inducidos a nivel celular, dependiendo del TGF β con el que se trabaje, del tiempo de exposición a dichas citocinas y probablemente, esté implícita una modulación diferente, si se somete a los fibroblastos a una mezcla de éstas citocinas. Estos hallazgos podrían tener repercusiones muy importantes en el mejor entendimiento del establecimiento de padecimientos fibróticos. Cabe destacar que los datos anteriores contrastan con los obtenidos en fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar. Si bien se trabajó con un número muy reducido de muestras, y esto no permitiría llegar a conclusiones determinantes, se observaron tendencias claras y muy interesantes. A continuación se discutirán algunas de las posibles implicaciones de los resultados obtenidos (Adamson, 1995).

En general se observó que las células de pacientes fibróticos, independientemente de su origen (provenientes de pacientes con ES o FPI), respondieron de forma muy diferente a las diferentes formas estructurales del TGF β (después de 72 horas de cultivo), en comparación con la respuesta observada antes descrita, para los fibroblastos normales. En éstos fibroblastos "anormales", todas las formas estructurales del TGF β , a todas las dosis empleadas (altas y bajas), indujeron una estimulación de la proliferación.

El TGF β_1 y el TGF β_2 indujeron un efecto muy semejante entre sí, en la proliferación de éstos fibroblastos provenientes de pacientes fibróticos. Ambas citocinas indujeron un incremento mayor en la proliferación de fibroblastos de pacientes con ES, comparada con la estimulación inducida en fibroblastos de pacientes con FPI. Estos resultados contrastaron importantemente con el efecto inducido por el TGF β_3 , con quien se observó una inversión total de la tendencia antes descrita para las otras dos isoformas del TGF β , es decir, que esta isoforma del TGF β indujo un efecto estimulador mayor en los fibroblastos de pacientes con FPI comparado al inducido en pacientes con ES.

Aunque estos resultados podrían ser reflejo de los diferentes estadios de la enfermedad de cada uno de los pacientes de los que se tomaron las biopsias, resultaría difícil establecer mecanismos comunes, considerando todos los problemas que implica el trabajo con muestras de pacientes. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan el planteamiento establecido anteriormente, que postula la existencia de una modulación inducida por las diferentes formas estructurales del TGF β en la proliferación fibroblástica. Al parecer esta modulación, además es diferente en fibroblastos normales y fibróticos y depende de la isoforma de TGF β , del tipo de enfermedad fibrótica de la que se trate y de las concentraciones de TGF β empleadas. Estos resultados nuevamente confirman el hecho de que aunque entre los diferentes padecimientos fibróticos existen algunos fenómenos comunes, los mecanismos de patogénesis son aparentemente diferentes en cada uno de éstos.

Al respecto, en la literatura se ha reportado (Moreland 1992), que LBA de voluntarios sanos poseen concentraciones más altas de TGF β , que los LBA de pacientes con ES. Esto podría explicar la mayor sensibilidad y diferente actividad fibroblástica, observada en los fibroblastos de los pacientes fibróticos (FPI y ES) a las diferentes formas estructurales del TGF β , a través del tiempo. Sin embargo, algo que es evidente a partir de nuestros resultados, es que existe una modulación de la actividad inducida por TGF β , dependiendo de la isoforma, de la concentración empleada, del tiempo de exposición a ésta y del origen del fibroblasto (sano o normal).

Estas observaciones confirman, el hecho de que de alguna manera existe una modulación fibroblástica diferente en los pacientes con fibrosis. El estudio de esta modulación diferente podría ayudar en el entendimiento de la enfermedad y la optimización o implementación de nuevos tratamientos.

METABOLISMO DE COLAGENA

El TGF β es un potente estimulador del metabolismo de la colágena en fibroblastos (Varga y Jimenez, 1986). Este ha sido inmunolocalizado en áreas fibróticas de pulmones de pacientes con fibrosis (Hamison, 1993, Kulozik, 1990). Estas observaciones sugieren que podría tener un papel fundamental en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, enfermedad caracterizada por el excesivo depósito de colágena en el intersticio pulmonar. Por otra parte, en estudios previos se ha demostrado que TGF β , está presente en el líquido que recubre al pulmón fibrótico (Tani, 1988, Moreland, 1992, Khalil, 1991). Estos antecedentes remarcan la

importancia del estudio de la actividad de las diferentes formas estructurales del TGF β , ya que si cada uno de éstas ejerciera un efecto diferente, o bien, modulara la actividad de otros factores, podríamos entender mejor la patogénesis de la fibrosis pulmonar.

En este trabajo, no se observó ninguna diferencia entre la actividad inducida por las diferentes formas estructurales del TGF $\beta_{(1-3)}$, en el metabolismo de la colágena en fibroblastos de pulmón humano normal (HLF-1). Cada una de estas citocinas, indujo un incremento en la síntesis y un decremento en la degradación de la procolágena, semejante a lo reportado para TGF β , (Fine, 1987, Fine, 1991, Campa, 1990).

Estos datos correlacionan con los resultados obtenidos en la proliferación celular de las mismas células inducida por los TGF β s después de 24 horas de cultivo, (mismo tiempo en que se desarrolla el ensayo de evaluación del metabolismo de la colágena), donde tampoco hubo ninguna diferencia significativa en el efecto inducido por los tres TGF β s.

QUIMIOTAXIS

Ni en los fibroblastos de pacientes con fibrosis (ES y FPI), ni en los fibroblastos normales, ninguna de las formas estructurales del TGF β , indujeron quimiotaxis. Estos resultados son congruentes con otros obtenidos por nosotros y reportados previamente (Osorio, 1993), en los que se había encontrado que el TGF β , no era capaz de inducir efecto quimiotáctico en fibroblastos de pulmón de rata. Cabe destacar sin embargo, que sí se ha encontrado actividad quimiotáctica inducida por LBA de pacientes con alveolitis fibrosante (Behr, 1993).

En resumen, las diferentes formas estructurales del TGF β_2 y TGF β_3 tienen un efecto semejante al TGF β , en cuanto a proliferación fibroblástica se refiere, sólo a las 24 horas de cultivo. En general parecen ejercer una modulación de la proliferación fibroblástica dependiendo de el tipo celular: normal o de pacientes fibróticos, del tipo de fibrosis, del tiempo de cultivo y de la concentración empleada. No se encontró ninguna diferencia significativa entre el efecto estimulador de la producción de procolágena inducido por TGF β , y el inducido por los TGF β_2 y TGF β_3 . Ninguna de las formas estructurales del TGF β indujo quimiotaxis en fibroblastos normales ni de pacientes fibróticos. Estos resultados sugieren que los diferentes TGF β s están involucrados en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, en cuanto a la regulación

de fenómenos de proliferación y metabolismo de la colágena, pero no en cuanto a la quimioatracción de estas células a los sitios de lesión en el pulmón.

EXPRESION Y SECRECION DE PDGF POR MACROFAGOS ALVEOLARES EXPUESTOS A PARTICULAS INORGANICAS

Los hallazgos antes presentados, demuestran la actividad fibroblástica inducida por la trombina pura y presente en LBA de pacientes con ES y del TGF β y tres de sus formas estructurales en la proliferación celular y el metabolismo de colágena de fibroblastos pulmonares. Sin embargo, una limitación del estudio es que, hasta este punto se ha dado poca importancia a la fuente potencial generadora de tales factores de crecimiento. Se sabe por ejemplo, que el TGF β y muchas de sus formas estructurales son producidas por los mismos fibroblastos, el IGF-1 es producido por macrófagos (Rom, 1988) y fibroblastos pulmonares (Atkinson 1980), la trombina sólo es producida en el hígado (Bar-Shavit, 1992) y el PDGF es producido MA (Shimokado 1985) y fibroblastos (Lasky, 1995).

Por lo que en este capítulo, se trabajó con macrófagos alveolares de rata, células productoras de PDGF, y se investigó su capacidad de producir PDGF *in vitro* a partir de un estímulo externo (partículas de hierro carbonilo). La producción de PDGF se evaluó empleando como parámetros de actividad, la expresión génica de cada una de las cadenas del PDGF A y B y la secreción del producto al medio. Por otra parte, se evaluó la capacidad de cada una de los dímeros del PDGF, para inducir actividad biológica diferencial, empleando como parámetro biológico la quimiotaxis inducida en fibroblastos de pulmón de rata.

Trabajos previos han demostrado que el PDGF es quimiotáctico para fibroblastos de piel y pulmón de rata (Seppa 1982, Osomio 1990). Así mismo se ha reportado efecto diferencial de cada uno de los dímeros del PDGF en la proliferación de fibroblastos de pulmón de rata (Bonner 1990). Los resultados del presente trabajo, demostraron que los diferentes dímeros del PDGF inducen una actividad quimiotáctica diferente en fibroblastos de pulmón de rata.

Se observó que los dímeros BB y AB del PDGF inducían un incremento en la quimiotaxis de dichas células, mientras que el dímero AA, no indujo mayor efecto en ésta. Un efecto cualitativamente similar pero cuantitativamente diferente se observó en células Swiss 3T3. Esto sugiere la importancia del tipo celular y el número de receptores celulares para cada

dímero del PDGF, en la respuesta inducida por ésta citocina (Bonner, 1994, Bonner, 1995). Estos resultados coinciden con reportes previos en los que se había encontrado un efecto similar en células de músculo liso (Grotendorst 1982).

En el modelo empleado para inducir la estimulación de PDGF en macrófagos alveolares de rata, se ha comprobado ampliamente que estas células al ser expuestas *in vitro* a partículas inorgánicas (asbesto, cuarzo, hierro carbonilo, etc.) secretan PDGF (Bauman 1990). En este caso particular se observó una expresión diferencial de las cadenas del PDGF A y B en el tiempo. Las partículas de hierro carbonilo, indujeron la expresión inmediata del gen del PDGF que codifica para la cadena B. Esta expresión fue disminuyendo conforme paso el tiempo de exposición de los MA a las partículas.

La expresión del gen de la cadena A en cambio, se expresó hasta después de una hora de iniciada la exposición celular a las partículas y alcanzó un máximo hasta después de 4 horas. Esta expresión diferencial de los genes que codifican para las cadenas del PDGF, sugiere la presencia de diferentes concentraciones de dímeros en el microambiente celular, a diferentes tiempos, y debido a que cada uno de estos tiene un efecto biológico diferente, esto sugiere un mecanismo de modulación de la actividad biológica de esta citocina, dependiente de la concentración y secuencia de aparición de los dímeros en cultivo.

Estos resultados podrían tener implicaciones interesantes en padecimientos fibróticos, y de hecho se han encontrado algunas evidencias experimentales de esto, por ejemplo, se ha reportado una expresión génica incrementada de PDGF B en pulmones de ratas con hiperóxia crónica (Fabisiak 1989, Han 1992), en piel de pacientes con escleroderma (Gay, 1989), en macrófagos alveolares de pacientes con FPI (Martinet 1986, 1987, Vignaud 1991). Estos hechos determinan no sólo la participación de PDGF en padecimientos fibróticos, sino que además, apoyan la hipótesis de que una modulación diferente a la normal puede ser el evento desencadenante de la fibrosis pulmonar.

En cuanto a la secreción del PDGF al medio, se observó que las partículas de hierro carbonilo incrementaron significativamente la secreción de PDGF en los macrófagos alveolares. Este incremento alcanzó un máximo (9.2 ng/ml) después de 2 horas de exposición de los MA a las partículas y representó aproximadamente el doble de la cantidad de PDGF secretada constitutivamente (en células no estimuladas con partículas). Estos resultados

correlacionan con las observaciones hechas en cuanto a la expresión génica del PDGF, ya que se observó un máximo de expresión de PDGF B inmediatamente, y aunque el máximo de secreción de PDGF total, se detectó hasta 2 horas después, el incremento en la secreción de la proteína, que fué aumentando paulatinamente desde los primeros minutos de exposición celular a las partículas.

Es importante destacar, que el anticuerpo empleado identifica principalmente a los dímeros BB y AB del PDGF, por lo que probablemente no estemos observando la secreción de AA al medio. Sin embargo, la caída en la secreción de PDGF al medio coincide con la máxima expresión del gen de PDGF que codifica para la cadena A (esta inicia desde la primera hora de exposición de los MA a las partículas inorgánicas), lo que podría sugerir el papel de este dímero como modulador de la actividad de PDGF B.

La disminución en la expresión génica del PDGF B o la caída en la secreción de PDGF observada después de 4 horas, no pudo atribuirse al decremento en la viabilidad celular de los MA. Esta fué verificada durante los distintos tiempos del experimento y sólo se observó una disminución no significativa de la viabilidad (12 %), hasta después de 20 horas. Cabe mencionar que estos resultados, también dieron lugar a otra pregunta importante de resolver, en el estudio de la regulación de la actividad fibroblástica inducida por PDGF y sus implicaciones en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Y es: ¿Cuál es el efecto de las mezclas de los dímeros de PDGF en quimiotáxis y proliferación de fibroblastos pulmonares?, misma en la que se trabajó y se reportó recientemente (Osorio, 1995). Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de modulación ente las diferentes formas estructurales del PDGF.

El trabajo tiene implicaciones importantes, desde el punto de vista de que plantea mecanismos alternativos de modulación fibroblástica, relevantes probablemente en otro tipo de fibrosis pulmonares, inducidas por la inhalación de partículas inorgánicas y diferentes a las antes mencionadas (FPI y ES) y en las que aparentemente participan factores de crecimiento diferentes que sufren una modulación diferente.

Tomando en consideración toda la información antes presentada, se puede deducir que los factores de crecimiento, modulan diversas funciones biológicas de diferente forma. Los tres factores en estudio: la trombina, tres de las formas estructurales del TGF β (1, 2 y 3) y el

PDGF son importantes en la patogénesis de la fibrosis pulmonar a diferentes niveles y en diferentes padecimientos.

La trombina parece ser relevante y específica de padecimientos de fibrosis pulmonar asociados a esclerosis sistémica, y actúa aparentemente regulando la proliferación fibroblástica y el metabolismo de la colágena; mientras que cada una de las isoformas del TGF β parecen tener una actividad diferente en el tiempo, dependiente de la concentración de dichas citocinas y del fenotipo celular (normal o proveniente de pacientes con fibrosis pulmonar), y del tipo de fibrosis (FPI o ES). Esto podría explicar el hecho de que algunos TGF β s, sólo se han detectado en fases tempranas de padecimientos fibróticos, mientras que otros se expresan y secretarán sólo en fases tardías (Khalil, 1991). En cambio del PDGF induce efecto quimiotáctico diferencial en fibroblastos pulmonares de rata, dependiendo de la concentración y el dímero con el que se trabaje e induce su expresión y secreción por agentes externos (partículas inorgánicas).

EL FIBROBLASTO COMO CELULA EFECTORA

Los fibroblastos de pulmón humano empleados para el desarrollo del presente trabajo (IMR 90 y HLF-1), requirieron un tiempo mínimo de 8 a 24 h para que el factor de crecimiento en cuestión (trombina ó TGF β), interactuara con su receptor, e indujera probablemente la secreción de un segundo mensajero y se iniciará la división celular. La máxima respuesta proliferativa observada para estos mediadores se encontró a las 48 y 72 horas.

Sin embargo, estos fibroblastos requirieron de 48 h de exposición a los factores de crecimiento presentes en las muestras de LBA de pacientes con diferentes tipos de fibrosis pulmonar, antes de poder observar alguna respuesta. Estos datos sugieren que la regulación de la actividad fibroblástica inducida *in vivo*, es más compleja y requiere de un mayor número de pasos antes de que se observe algún efecto biológico medible. El uso de LBA, si bien está lejos de mimetizar las condiciones del trabajo *in vivo*, nos acerca un poco más, a los eventos que suceden en los pulmones de pacientes con fibrosis.

Los resultados obtenidos con muestras de LBA, pueden explicarse considerando cualquiera de 3 posibilidades: Primeramente debe considerarse que tal vez no hubiera un nivel suficiente de de factores de crecimiento en el LBA para activar a los fibroblastos directamente a su división celular, segundo, los factores de crecimiento modulan la respuesta de

proliferación fibroblástica en forma negativa y positiva, ambos moduladores podrían estar presentes en las muestras de LBA.

Los efectos que evaluamos sólo son el resultado del balance neto entre estos efectos en los fibroblastos en el parámetro biológico a evaluar: la división celular. Esto puede ocurrir de una gran variedad de formas a) los reguladores negativos interactúan con el receptor, son internalizados y degradados, b) estos podrían ser secuestrados en la matriz extracelular fibroblástica o c) los fibroblastos producen proteasas que degradan, inactivan o secuestran a diferentes proteínas, entre otras, dichos moduladores positivos y negativos de crecimiento fibroblástico d) proteínas "secuestradoras" ATIII y α_2 -macroglobulina.

Tercero los factores de crecimiento presentes en fluidos biológicos como los LBA estimulan al fibroblasto a producir factores de crecimiento autócrinos que a su vez estimulan la división celular independientemente de los mediadores presentes en LBA, debido tal vez a los bajos niveles de los mismos o a su combinación con ellos. Los experimentos realizados en el presente trabajo no confirman ninguna de las hipótesis planteadas, sin embargo, es muy probable que una combinación, o de hecho todos los mecanismos antes mencionados estén en operación.

Por otro lado, es necesario mencionar que este tipo de modulación fibroblástica mencionada anteriormente, puede aplicarse para el caso del uso de factores de crecimiento puros como el TGF β , cuya regulación depende de factores similares. En este caso, es importante destacar que los diferentes TGF β indujeron un efecto muy diferente en células normales y provenientes de pacientes con fibrosis. También se observó una respuesta diferente dependiendo del tipo de fibrosis del que provenían los fibroblastos. Esto apoya la hipótesis de que existe una modulación diferente en padecimientos específicos y probablemente nos acerque más al entendimiento de la fibrosis pulmonar. Aseveraciones semejantes a las antes mencionadas para proliferación celular podrían estar implicadas en la modulación fibroblástica de la quimiotaxis y el metabolismo de la colágena.

MODULACION DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA INDUCIDA POR FACTORES DE CRECIMIENTO

Una de las mayores ventajas que ofrecen los experimentos de cultivo de células, es que brindan información acerca del comportamiento de poblaciones puras y además permiten

la caracterización de mediadores que modulan diversas actividades biológicas. En este caso específico se estudió la modulación fibroblástica a nivel de proliferación celular, metabolismo de colágena y quimiotáxis.

Es importante mencionar que existe evidencia experimental que sugiere, que la modulación fibroblástica inducida por los diferentes factores de crecimiento, es resultado de la interacción entre ellos. Por ejemplo, se sabe que la trombina induce la expresión, secreción y liberación de factores de la matriz extracelular como el PDGF (Ohba, 1994), el TGF β (Taipale 1992), el bFGF (Benezra 1993), la endotelina-1 (Schini, 1989), etc. Por otro lado, se sabe que el TGF β induce la secreción de PDGF (Leof, 1986) y que éste último puede a su vez, mediante el dímero BB inducir la expresión de TGF β .

Todas estas complejas interacciones, que sólo incluyen a los tres factores de crecimiento estudiados en el presente trabajo, son una muestra de que la interacción entre diferentes citocinas debe ser la base de la modulación fibroblástica y que es mucho más complicada de lo que se piensa. Debe considerarse además, que no sólo las tres citocinas en estudio están involucradas, sino que existen muchas más, algunas de ellas no bien caracterizadas todavía. Sin embargo, el estado del arte en esta área del conocimiento, apenas nos permite empezar a entender la actividad de los diferentes factores de crecimiento puros. Esto servirá como base para profundizar en el conocimiento y el entendimiento de la interacción entre diversos factores de crecimiento y su efecto en la modulación de diferentes tipos de actividad biológica.

Aunado a todas las complejas interacciones entre citocinas, es indispensable considerar, que cada una de éstas induce un diferente tipo de actividad biológica (proliferación, síntesis de colágena, quimiotáxis, etc.) y que entonces la evaluación que realizamos en los parámetros biológicos como proliferación, quimiotáxis, y el metabolismo de la colágena, son el resultado de interacciones muy complejas y que estamos distantes de entender.

MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA FIBROSIS PULMONAR

Los modelos *in vitro* (Bauman 1990) y modelos experimentales *in vivo* (Laurent, 1981, Phan, 1981, Brody, 1981, Fine, 1991,) han sido muy útiles en el estudio de la fibrosis

pulmonar, sin embargo los estudios con material proveniente de pacientes es más valioso (nos acerca más al fenómeno verdadero) pese a que posee algunas desventajas. Los estudios en humanos pueden realizarse de diversas maneras incluyendo estudios epidemiológicos, estudios de tejido pulmonar por biopsia, estudio de células pulmonares, secreciones y pruebas serológicas. La principal limitante de los estudios en humanos, es la dificultad de obtener una muestra adecuada, la reproducibilidad de los mismos y el hecho de que no se tiene la seguridad de que la muestra con la se cuenta, represente el proceso patológico del pulmón. Además el estado clínico de cada paciente puede ser diferente.

Con propósitos experimentales, la biopsia pulmonar a pulmón abierto es una de las pruebas más útiles, pero solo puede realizarse en un número reducido de casos en los que por indicación clínica es requerida. Las biopsias transbronquiales via broncoscopio de fibra óptica son realizados mas comunmente aunque solo una pequeña cantidad de tejido es obtenido.

El pequeño número de células recuperado de una biopsia, es una de las mayores limitantes de éste método; sin embargo esta técnica a sido ampliamente usada en la determinación de la proporción de diferentes subclases de linfocitos y las funciones y características de los macrófagos. Esta técnica también ha sido empleada en el aislamiento de fibroblastos, células epiteliales y endoteliales para el estudio de agentes fibróticos *in vitro*.

Los lavados broncoalveolares son una técnica relativamente no invasiva, con baja morbilidad y que se ha aplicado en el estudio de una gran variedad de enfermedades pulmonares intersticiales. Los LBA ofrecen la gran ventaja de poder ser realizables en estudio seriados. Estos también proveen una fuente de células viable en la suficiente cantidad para desarrollar una gran variedad de pruebas funcionales. Además también provee información sobre tipos de células presentes en la parte baja del tracto respiratorio, y las cuentas celulares en LBA correlacionan muy cercanamente con aquéllas obtenidas histológicamente en los espacios aéreos (Davis, 1976, Hamison, 1995, Cambrey, 1995); aunque los índices celulares de los LBA no reflejan los índices del intersticio pulmonar (Davis, 1978).

Algunos investigadores han encontrado que la técnica de LBA afecta al recubrimiento celular pulmonar. La fuerza con la que el fluido se introduce en el pulmón, el número de alícuotas de lavado que se usan, el volumen total de líquido introducido y la presencia de aditivos, por ejemplo lidocaina, afectan la proporción y el tipo de células que recubren la superficie pulmonar (Hoyt, 1988). Todos estos datos subrayan los problemas en la

interpretación de los resultados obtenidos a partir de las muestras de LBA, aunque la mayoría de los investigadores lo usan como procedimiento estándar.

PERSPECTIVAS FUTURAS

En esta tesis se investigó la modulación fibroblástica inducida por factores de crecimiento: la trombina, el TGF β y el PDGF. Dichos resultados permitieron establecer correlaciones al respecto de las implicaciones de estas modulaciones en la patogenésis de la fibrosis pulmonar. Se trabajó en tres sistemas biológicos distintos. En el primero de éstos se determinó el papel de la trombina presente selectivamente en LBA pacientes con fibrosis pulmonar asociada a esclerosis sistémica y no a LBA de pacientes con FPI y sarcoidosis. Se encontró que ésta indujo un incremento en la proliferación, en la síntesis y en la expresión de la procolágena, de fibroblastos fetales de pulmón humano, así mismo se observó un decremento en su degradación.

En el segundo se determinó el efecto de tres de las diferentes formas estructurales del TGF $\beta_{(1-3)}$ en la proliferación, quimiotáxis y el metabolismo de colágena de fibroblastos fetales de pulmón humano normal y de pacientes con fibrosis pulmonar. Se encontró que en cuanto a proliferación celular, cada una de los TGF β induce un efecto diferente dependiendo de la concentración y el tipo celular empleado (normal o de pacientes fibróticos, y tipo de fibrosis). Ningún TGF β indujo quimiotáxis de fibroblastos normales o de pacientes con fibrosis y todos estimularon la síntesis de colágena en forma semejante a la ya reportado para TGF β 1.

Finalmente se determinó que cada uno de los dímeros del PDGF induce un efecto diferente en fibroblastos de pulmón de rata. Esto dió relevancia a la investigación de la potencial expresión, diferencial de los genes A y B del PDGF y a la secuencia de aparición del producto en el medio, por lo que se estudio la expresión y secreción de PDGF en células productoras de PDGF como los MA después de un estímulo con partículas inorgánicas.

Los resultados demostraron que partículas inorgánicas de hierro carbonilo indujeron la expresión y secreción de PDGF. Esta expresión fue diferente para PDGF A y B, primero se expresó PDGF B y luego (4 horas después) PDGF A, estos datos correlacionan con la secreción de la proteína al medio que alcanzó un máximo después de 2h. Estos resultados también sugieren la modulación de PDGF B inducida por PDGF A.

Toda esta evidencia experimental apoya la hipótesis de que la modulación fibroblástica inducida por los diferentes factores de crecimiento en estudio, podría ser relevante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Sin embargo, algunas preguntas muy concretas y que se derivan directamente de los resultados obtenidos con este trabajo, y que marcan líneas de investigación futura son:

- El uso de fibroblastos de pulmón humano adulto normal como control para comparar las respuestas reportadas en este trabajo y que fueron obtenidas en fibroblastos fetales de pulmón humano. Cabe mencionar que existe la gran desventaja de que éstas líneas provenientes probablemente de biopsias, es decir un cultivo primario, no permiten la evaluación rápida (éstas crecen más lento, menor número de pases en menos tiempo) y también envejecen más rápido, esto es que hay un menor número de pases viables para evaluación de actividad biológica, lo que dificulta el trabajo con ellas.

- El trabajo con fibroblastos de pacientes con diferentes tipos de fibrosis pulmonar, la evidencia encontrada en el presente trabajo con unas cuantas muestras sugiere una modulación biológica diferente, inducido en estos fibroblastos que la observada en fibroblastos normales. Pese a las dificultades inherentes asociadas al trabajo con células de pacientes fibróticos, se sugiere continuar el estudio en éstas a fin de lograr un mejor entendimiento de la modulación fibroblástica inducida por diferentes factores de crecimiento en estos tipos celulares y establecer su relevancia en padecimientos concretos, además al estar trabajando con células modificadas por el padecimiento, estaríamos trabajando en un contexto más cercano a la realidad del padecimiento pulmonar.

- Considerar otros factores producidos por células residentes del pulmón como las células endoteliales (MacCumber, 1989, Hiroe, 1989, Yanagisawa, 1988), las epiteliales (Giaid, 1991, Mattoli 1990, Springall 1991), los macrófagos alveolares (Ehrenreich, 1990) y los mismos fibroblastos (Gu 1991), que liberan factores como la ET-1, diferentes tipos de interleucinas en respuesta a lesiones tisulares (O'Brien, 1987) o bien, que responden a estímulos como la presencia de trombina (Schini 1989, Kohono, 1990) y a otras citocinas liberadas de linfocitos o macrófagos activados (Yoshizumi 1991), o bien debido a la presencia de una alta actividad proteolítica en estas muestras que puede dar por resultado la activación de precursores o factores latentes presentes o almacenados en la matriz extracelular.

- Estudios futuros en los que se podrían emplear combinaciones de antagonistas y anticuerpos neutralizantes de la actividad de los factores de crecimiento, podrían ayudar en la identificación de otros mediadores que contribuyen a la modulación del metabolismo de la colágena *in vitro* y permitirán especular acerca de como actúan concertadamente dichos factores.

En otros estudios podrían emplearse LBA para medir citocinas e iniciar un intento de dilucidar los mecanismos de modulación fibroblástica a nivel de proliferación, metabolismo de colágena y quimiotaxis utilizando mezclas de anticuerpos y antagonistas de los receptores de diferentes factores de crecimiento a fin de determinar la contribución de la interacción entre estos. Así mismo deberían desarrollarse estudios en los que se determine el efecto de los LBA en otros tipos celulares como las células endoteliales y epiteliales que alternativamente podrían ser co-cultivadas con fibroblastos para determinar así el efecto de sus productos en la activación fibroblástica.

Por otro lado, estudios futuros podrían encaminarse a dilucidar la fuente de diversos mediadores por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, tanto en modelos animales de fibrosis pulmonar como en sujetos humanos. Estos estudios podrían encaminarse a modular la enfermedad, en modelos animales por lo pronto, usando antagonistas de receptores o anticuerpos de factores de crecimiento modeladores de la actividad fibroblástica. Estos estudios no solo brindarían información útil para el mejor entendimiento de los mecanismos en la patogénesis de la fibrosis pulmonar sino que además, podrían indicar caminos específicos en el mejoramiento de las estrategias terapéuticas aplicadas a pacientes con este tipo de padecimiento.

Estos resultados sugieren la existencia de complejas interacciones entre diferentes factores de crecimiento fibroblástico que podría estar involucradas en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Además puede deducirse que éstas pueden variar durante la progresión de la enfermedad. Considerar estas reflexiones sería de crucial relevancia el estudio del efecto inducido por diferentes combinaciones de factores de crecimiento y tejido pulmonar. Esto, si bien complicaría los sistemas en estudio, ayudaría a la dilucidación de las interacciones entre éstos y probablemente nos acercaría al entendimiento de los sucesos *in vivo*

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abramson, S.R., Conner, G.E., Nagase, H., et al. Characterization of rat uterine matrilysin and its cDNA. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 16016-16022.
- Adamson, I.Y.R., Hedgecock, C. Patterns of particle deposition and retention after instillation to mouse lung during acute injury and fibrotic repair. *Exp. Lung Res.* 1995; 21: 695-709.
- Agostini, C., Garibsa, S., Trentin, L., Zambello, R., Fastelli, G., Onisto, M., Cipriani, A., Festi, G., Casara, D., Semezzato, G. Pulmonary alveolar macrophages from patients with active sarcoidosis express type IV collagenolytic proteinase: an enzymatic mechanism for influx of mononuclear phagocytes at sites of disease activity. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 605-612.
- Amenta, P.S., Gil, J., Martínez-Hernández, A. Connective tissue of rat lung II: ultrastructural localization of collagen types III, IV and VI. *J. Histochem. Cytochem.* 1988; 36: 1167-1173.
- Ando, K., Hirata, Y., Shichiri, M., Emori, T., Marumo, F. Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS Letts.* 1989; 245:164-166.
- Antoniades, H.N., Bravo, M.A., Avila, R.E., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J., Maxwell, M., Selman, M. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1990; 86: 1055-1064.
- Argelli, M., Wahl, S. Cytokines and fibrosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1986; 4: 379-388.
- Armenta-Carrillo, S., Hernández-Rodríguez, N.A., Osomio-Vargas, A.R. Generación de factores quimiotácticos para macrófagos alveolares, después de la instilación con asbesto crisótilo. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 1993; 6: 63-70.
- Arribas, J., Massague, J. TGF α and β amyloid precursor mechanism. *J. Cell. Biol.* 1995; 128: 433-441.
- Ashton, R.W., Scheraga, H.A. Preparation and characterization of anhydro-thrombin. *Biochem.* 1995; 34: 6454-6463
- Assouan, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.C., et al. Expression and secretion of type β TGF activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987; 84: 6020-6029.
- Atkinson, P.R., Weidman, E.R., Bhaumick, B., Bala, R.M. Release Of somatomedin-like activity by cultured WI-38 human fibroblasts. *Endocrinology.* 1980; 106: 2006-2012.
- Avery, A., Said, S. Surface phenomena in lungs in health and disease. *Medicine.* 1966; 44: 503-526.
- Ashton, R.W., Scheraga, H.A. Preparation and characterization of anhydro-thrombin. *Biochem.* 1995; 34: 6454-6463.
- Bartle, F.A., Guzowski, D.E., Ripley, C., Siddiqi, Z-E, Bienkowski, R.,S. Ammonium chloride inhibits basal degradation of newly synthesized collagen in human fetal lung fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990; 276: 125-131.
- Bar-Shavit, R., Sabbah, V., Lampugnani, M.G., Marchisio, P.C., Fenton, J.W.II., Vlodavsky, I., Dejana, E., An Arg-Gly-Asp-sequence within thrombin promotes endothelial cell adhesion. *J. Cell. Biol.* 1991;112:335-342.
- Bar-Shavit, R., Ben Ezra, M., Sabbah, V., Bode, W., Vlodavsky, I. Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992; 6: 123-130.
- Bar-Shavit, R., Kahan, A.J., Mann, K.G., Wilner, G.D. Growth promoting effects of esterolytically inactive thrombin. *Cell Biochem.* 1986; 32: 261-272..

- Bar-Shveit, R., Kahan, A.J., Mann, K.G., Wilner, G.D., Fenton, W. II. Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. *Science*, 1983; 220: 729-731.
- Bar-Shavit, R., Benezra, M., Elder, A., Hy-Am, E., Fenton, W., II, Vlodavsky, I. Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action. *Cell Regul.* 1990; 1: 453-463.
- Bar-Shavit, R., Benezra, M., Sabbah, V., et al. Functional domains in the outside the catalytic site: cellular interaction. En:Thrombin structure-function. L. Berliner Editor. Plenum Publishing Copr. New York, 1992.
- Bar-Shavit, R., Elder, A., Vlodavsky, I. Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix: protection and expression of functional properties. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 1096-1104.
- Baserga, R. The biology of cell reproduction. Cambridge, MA: Harvard University Press. 1985.
- Baserga, R. Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell.* 1994; 79: 927-930.
- Bassett, F., Soler, P. Connective tissue in pulmonary alveolar damage and repair. *Bull Finlj LongaAv.* 1987; 12: 68-72.
- Bateman, E.D., Turner-Warwick, M., Adelman-Grill, B.C. Immunohistochemical study of collagen types in human foetal lung and fibrotic lung disease. *Thorax.* 1981; 36: 645-653.
- Battergay, E.J., Raines, E.W., Sifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., Ross, R. TGF β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell.* 1990; 179: 311-317.
- Baum, B.J., Moss, J., Breul, S.D., Berg, R.A., Crystal, R.G. Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 2843-2847.
- Bauman, M.D., Jetten, A.M., Bonner J.C., Kumar, R.K., Bennet, R.A., Brody, A.R. Secretion of a platelet-derived growth factor homologue by rat alveolar macrophages exposed to particles in vitro. *Eur. J. Cell. Biol.* 1990; 51: 327-334.
- Baumgartner, S., Deng, J-S., Grau, R. Evidence for low grade coagulation abnormalities in progressive systemic sclerosis. *Arthr. Rheum.* (abstract). 1980; 23: 652.
- Begin, R., Bisson, G., Lambert, R. Gallium 67 uptake in the lung of asbestos-exposed sheep, early association with enhanced macrophage-derived fibronectin accumulation. *J. Nucl. Med.* 1986; 27: 538-547.
- Behr, J., Adelman-Grill, B.C., Krombach, F. et al. Fibroblast chemotactic response elicited by native bronchoalveolar lavage fluid from patients with fibrosing alveolitis. *Thorax.* 1993; 48: 736-742.
- Benezra, M., Vlodavsky, I., Ishai-Michaeli, R., Neufeld, G., Bar-Shavit, R. Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor heparan sulphate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood.* 1993; 81: 3324-3331.
- Bennett, V.D., Weiss, I.M., Adams, S.L. Cartilage-specific 5' end of chick $\alpha 2(I)$ collagen mRNA. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 8402-8409.
- Berbinschi, A., Ketsieslegers, J.M. Endothelin in urine. *Lancet.* 1989; 2: 46-47.
- Berg, R.A. Intracellular turnover of collagen. En: Regulation of matrix accumulation. Mecham, R.P. (ed), Academic Press, New York, 1986: 29-52.

- Berk, B.C., Tauman, M.B., Griendling, K.K., Cragoe, E.J., Fenton, J.W., Brok, T.A. Thrombin stimulates events in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.* 1991; 275: 799-805.
- Beutler, B., Cerami, A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316: 379-385.
- Beutler, B., Cerami, A. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry.* 1988; 27: 7575-7582.
- Blenkowski, R.S., Cowan, M.J., McDonald, J.A., Crystal, R.G. Degradation of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.* 1978a; 253: 4356-4363.
- Blenkowski, R.S., Baum, B.J., Crystal, R.G. Fibroblasts degrade newly-synthesized collagen within the cells before it is secreted. *Nature.* 1978b; 276: 413-416.
- Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Adelberg, S., Crystal, R.G. Role of fibronectin as a growth factor for fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 1983; 97: 1925-1932.
- Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Adelberg, S., Crystal, R.G. Mechanisms of pulmonary fibrosis: spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 1801-1813.
- Bjerner, L., Thunell, M., Hallgren, R. Procollagen III peptide in bronchoalveolar lavage fluids: a potential marker of altered collagen synthesis reflecting pulmonary disease in sarcoidosis. *Lab. Invest.* 1986; 55: 654-656.
- Bjerner, L., Engstrom-Laurent, A., Lundgren, R., Rosenhall, L., Hallgren, R. Hyaluronate and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid as markers of disease activity in farmer's lung. *British. Med. J.* 1987; 295: 803-806.
- Bjerner, L., Lundgren, R., Hallgren, R. Hyaluronate and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 1989; 44: 126-131.
- Blobel, G. Synthesis and segregation of secretory proteins: the signal hypothesis. *En: Brinkley, B.P., Porter, K.R.*, eds. *International Cell Biology.* 1976-1977. New York, 1977 Rockefeller University Press. pp. 315-325.
- Bonner, J.C., Hoffman, M., Brody, A.R. Alpha-macroglobulin secreted by alveolar macrophages serves as a binding protein for a macrophage-derived homologue of platelet-derived growth factor. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1989; 1: 171-179.
- Bode, W., Baumann, M.I., Huber, V. et al. The refined 1.9A crystal structure of human α -thrombin interaction with D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Tyr inhibition segment. *EMBO J.* 1989, 8: 3467-3475.
- Bonner, J.C., Osornio-Vargas, A.R., Badger, A., Brody, A.R. Differential proliferation of rat lung fibroblast induced by platelet-derived growth factor PDGF-AA, -AB, and -BB isoforms secreted by rat alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1990; 5: 539-547.
- Bonner, J.C., Goodell, A.L., Lasky, J.A., Hoffman, M.R. Reversible binding of platelet-derived growth factor-AA, AB, and -BB isoforms to a similar site on the "slow" and "fast" conformations of the α_2 -macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 12837-12844.
- Bonner, J.C., Goodell, A.L., Coin, P.G., Brody, A.R. Chrysotile asbestos up regulates gene expression and production of alpha-receptors for platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 425-430.
- Bonner, J.C., Osornio-Vargas A.R. Differential binding and regulation of Platelet-Derived Growth Factor A and B chain isoforms by α_2 -macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 16236-16242.

- Bonner, J.C., Badgett, A., Lindros, P.M., Osornio-Vargas, A.R., TGF β 1 downregulates the Platelet-Derived Growth Factor α receptor subtype on human lung fibroblasts *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 13: 496-505.
- Bowen-Pope, D.F., DiCorleto, P.E., Ross, R.R. Interactions between receptors for platelet-derived growth factor and epidermal growth factor. *J. Cell. Biol.* 1983; 96: 679-683.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248.
- Brambilla, C., Abraham, J., Brambilla, E., Benirschke, K., Bloor, C. Comparative pathology of silicate pneumoconiosis. *Am. J. Pathol.* 1979; 97: 149-163.
- Braun-Falco, O., Rupec, M. Collagen fibrils of the scleroderma in ultrathin section. *Nature.* 1969; 202: 708-709.
- Bravo, R., Burkhardt, J., Curran, T., Muller R. Stimulation and inhibition of growth by EGF in different A 431 clones is accompanied by the rapid of c-myc and c-fos oncogenes. *EMBO J.* 1985; 4: 1193-1197.
- Broekelmann, T.J., Limper, A.H., Colby, T.V., MacDonald, J.A. Transforming growth factor β 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 6642-6646.
- Brody, A.R., Overby, L.H. Incorporation of tritiated thymidine by epithelial and interstitial cells in bronchoalveolar regions of asbestos-exposed rats. *Am. J. Pathol.* 1989; 134:133-140.
- Brody, A.R., Hill, L.H., Adkins, B., O'connor, R.W. Chrysotile asbestos inhalation in rats: deposition pattern and reaction of alveolar epithelium and pulmonary macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1981; 123: 670-677.
- Brody, A.R., Hill, L.H. Interstitial accumulation of inhaled chrysotile asbestos fibers and consequent formation of microcalcifications. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1982; 109: 107-118.
- Broekelmann, T.J., Limper, A.H., Colby, T.V., McDonald, J.A. Transforming growth factor β 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 6642-6646.
- Brown, K.D., Littlewood, C.J. Endothelin stimulates DNA synthesis in Swiss 3T3 cells: synergy with polypeptide growth factors. *Biochem. J.* 1989; 263: 977-980.
- Browse, N.L., Gray, L., Jarrett, P.E.M. Blood vein wall fibrinolytic activity in health and vascular disease. *Br. Med. J.* 1977; 1: 478-481.
- Burn, P.H. Cellular components of the alveolar unit. *Err: Current problems in clinical biochemistry.* 1983; 13; 11-22. The cells of the alveolar unit. Favez, G., Junod., Leuenberg, P. eds., Berne Hans Huber.
- Burton, K. A study of the conditions mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 1956; 62: 316-323.
- Cade, C., Ilozue, V., Rubanyi, G.M., Parker-Botelho, L.H. Smooth muscle cells release a diffusible factor responsible for decreasing big endothelin and endothelin produced by cultured endothelial cells. *J. Vasc. Med. Biol.* 1991; 2: 174-178.
- Cambrey, A.D., Mcanulty, R.J., Harrison, N.K., Dawes, K.E., Campa, J.S., duBois, R.M., Black, C.M., Laurent, G.J. Endothelin is present in the lungs of patients with systemic sclerosis and stimulates lung fibroblast replication *in vitro*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 145: A15.

- Cambrey, A.D., Harrison, N.K., Dawes, K.E., Southcott, A.M., Black, C.M., duBois, R.M., Laurent, G.J., McNulty, R. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994; 11: 439-445.
- Campa, J.S., McNulty, R.J., Laurent, G.J. Application of high-pressure liquid chromatography to studies of collagen production by isolated cells in culture. *Analyt. Biochem.* 1990; 186: 257-263.
- Campbell, P.M., LeRoy, E.C. Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1975; 4: 351-368.
- Campisi, J., Pardee, A.B. Post-transcriptional control of the onset of DNA synthesis by insulin-like growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 1984; 4: 1807-1814.
- Cantin, A.M., Boileau, R., Begin, R. Increased procollagen III amino-terminal peptide-related antigens and fibroblast growth signals in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 137: 572-576.
- Cardo-Cardo, C., Vlodavsky, I., et al. Expression of basic fibroblast growth factor in normal tissues. *Lab. Invest.* 1990; 63: 832-845.
- Carley, C. Isolation cultivation and partial characterization of microvascular endothelium derived from human lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1993; 7: 620-630.
- Carpenter, G., Cohen, S. Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* 1979; 48: 193-216.
- Carter, B.Z., Malter, J.S. Regulation of mRNA stability and its relevance to disease. *Lab. Invest.* 1991; 65: 610-621.
- Cernacek, P., Stewart, D.J. Immunoreactive endothelin in human plasma: marked elevations in patients with cardiogenic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 161: 562-567.
- Chang, L., Overby, L.H., Brody, A.R., Crapo, J.D. Progressive lung cell reactions and extracellular matrix production after a brief exposure to asbestos. *Am. J. Pathol* 1988; 131:156-170.
- Cheah, K.S.E., Grant, M.E., *En*: Weis, S.J., Jayston, M.I.V., eds. Collagen in health and diseases. London: Churchill Livingstone: 1982; pp. 73-100.
- Cheng, L.B., Buchanan, J.M. Mitogenic activity of blood components. I Thrombin and prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975; 72: 131-135.
- Cheng, W.T. Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movements. *J. Cell Biol.* 1986; 90: 187-200.
- Chomczynsky, P. and Sacchi, N. Simple-step method for RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 152-158.
- Chu, M.L., Myers, J.C., Bernard, Mo, et al. Cloning and characterization of the overlapping cDNA specific for human $\alpha 1(I)$ collagen chain. *Nucleic Acids Research.* 1982; 10: 5925-5934.
- Claman, H.N. On scleroderma: mast cells, endothelial cells and fibroblasts. *JAMA.* 1989; 262; 1206-1209.
- Clark, J.G. Madtes, D.K. Abstract *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 141: A96
- Cockayne, D., Sterling, K.M., Shull, S., Mintz, K.P., Ileyne, S., Cutroneo, K.R. Glucocorticoids decrease the synthesis of type I procollagen mRNAs. *Biochemistry.* 1986; 25: 3202-3209.
- Cohen, S., Carpenter, G., King, L. Epidermal growth factor receptor protein kinase interactions. *J. Biol. Chem.* 1980; 25: 4834-4842.

- Collins, M.K.L., Sিনnett-Smith, J.W., Rozengurt, E. Platelet-derived growth factor treatment decreases the affinity of the epidermal growth factor receptors of Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 1983; 258; 11689-11693.
- Collins, J.F., Smith, J.D., Coalson, J.J., Johanson, W.G. Variability in lung collagen amounts after prolonged support of acute respiratory failure. *Chest.* 1984; 85; 641-646.
- Craighead, J.E., Mossman, B.T. The pathogenesis of asbestos-related diseases. *N. Engl. J. Med.* 1982; 306: 1496-1502.
- Crouch, E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 1990; 259: L159-L184.
- Crystal, R.G. Gadek, J.E., Ferrans, V.J., Fulmer, J.D., Line, B.R., Hunninghake, G.W. Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging, and therapy. *AM. J. Med.* 1981; 70; 542-566.
- Crystal, R.G., Ferrans, V.J., Basset, F. Biologic basis of pulmonary fibrosis. *EN: The Lung; Scientific Foundations* eds. R.G. Crystal, JB West. Raven press Ltd. NY 1991. PP 2031-2046.
- Curran, T., Franza, B.R. Fos and Jun:AP-1 connection. *Cell.* 1988; 55; 395-397.
- Cutroneo, K.R., Sterling Jr., K.M., Shull, S. Steroid hormone regulation of extracellular matrix proteins. *En: Regulation of matrix accumulation* edited by Mechanm, R.P. Academic Press, New York. 1986. pp. 119-176.
- Danielpour, D., Spora, M. Differential inhibition of TGF β 1 and β 2 activity by α 2-macroglobulin *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 6973-6977.
- Dawes, K.E., Gray, A.J., Laurent, G.J., Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication. *Eur. J. Cell Biol.* 1993; 61; 126-130.
- Deak, S.B., Scholz, P.M., Armenta, P.S., Constantinou, C.D., Levi-Minzi, S.A., González-Lavín, L., MacKenzie, J.W. The substitution of arginine for glycine 85 of the α (1) procollagen chain results in osteogenesis imperfecta. The mutation provides evidence for three discrete domains of cooperative melting of intact type I collagen. *J. Biol. Chem.* 1991; 266. 21827-21832.
- Deguchi, Y. Spontaneous increase in TGF β production by bronchoalveolar mononuclear cells of patients with systemic autoimmune diseases affecting the lung. *Ann. Rheum. Dis.* 1992; 51; 362-365.
- Dehm, P., Prockop, D.J. Time lag in the secretion of collagen by matrix-free tendon cells and inhibition of the secretory process by colchicine and vinblastine. *Biochem. Biophys. Acta.* 1972; 264; 375-382.
- Dehm, P., Prockop, D.J. Biosynthesis of cartilage procollagen. *Eur. J. Biochem.* 1973; 35; 159-166.
- Denhardt, D.T., Edwards, E.R., Parfett, C.J.L. Gene expression during mammalian cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta.* 1985; 865; 83-125.
- Deuel, T.F., Senior, R.M., Huang, J.S., Griffin, G.L. Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J. Clin. Invest.* 1982; 69; 1046-1049.
- DiCorleto, P.E., Bowen-Pope, D.F. Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80; 1919-1923.
- Doumas, B., Watson, W., Biggs, H. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chem. Acta* 1971; 31; 87-96.

- Dulic, V., Kaufman, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, Th. D., et al. p53-Dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G₁ arrest. *Cell*. 1994; 76: 1013-1023.
- Duncan, M.R., Berman, B. Persistence of a reduced collagen producing phenotype in cultures scleroderma fibroblasts after short-term exposure to interferon's. *J. Clin. Invest.* 1987; 79: 1318-1324.
- Edington, T.S., The structural biology of blood coagulation. *Thromb. Haemost.* 1991; 66: 6-15.
- Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J.P., Angel, P., Heath, J.K. 1987. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor EMBO. *J. B.* 1987-1904.
- Ehrenreich, H., Anderson, R.W., Fox, C.H., Rieckmann, P., Hoffman, G.S., Travis, W.D. Coligan, J.E., Kehrl, J.H., Fauci, A.S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties are produced by human macrophages. *J. Exp. Med.* 1990; 172: 1741-1748.
- Elias, J.A. Tumor necrosis factor interacts with IL-1 and interferon's to inhibit fibroblast proliferation via fibroblast prostaglandin-dependent mechanisms. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 138: 652-660.
- Esmon, C.T. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science*. 1987; 235: 348-353.
- Fabisiak, J.P., Evans, J.N., Kelley, J. Increased expression of PDGF-B (c-sis) mRNA in rat lung precedes DNA synthesis and tissue repair during chronic hyperoxia. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1989; 1: 181-189.
- Falanga, V., Kruskal, J.B., Franks, J.J. Fibrin and fibrinogen-related antigens in systemic sclerosis (scleroderma). *J. Am. Acad. Dermatol.* 1991; 25: 771-775.
- Faller, D.V., Mundscha, L.T., Forman, L.W., Quiñones, M.A. V-mossupresses Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) type β receptor autophosphorylation and inhibits PDGF-BB-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 5022-5029.
- Fen, Z., Daniel, T.O. 5' untranslated sequences determine degradative pathways for alternative PDGF-B/c-sis mRNA's. *Oncogene* 1991; 6: 953-959.
- Fenton, J.W.II, Villanueva, G.B., Ofofu, F.A., Maraganore, J.M. Thrombin inhibition by hirudin: how hirudin inhibits thrombin homeostasis. 1991; 21: 27-31.
- Fenton II, J.W., Ofofu, F.A., Brezniak, D.V., Hassouna, H.I. Understanding thrombin and homeostasis. *Hematol. Oncol. Clin.* 1993; 7:1107-1119.
- Fine, A., Goldstein, R.H. The effect of transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 3897-3902.
- Fine, A., Goldstein, R.H., Gorson, L.S. Animal models of pulmonary fibrosis. *En: The Lung: Scientific Foundations* eds. RG. Crystal, JB West. Raven press Ltd. NY 1991. pp. 2047- 2057.
- Fleischmajer, R., Perlsh, J.S., Reeves, J.R.T. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arth. Rheum.* 1977; 20: 975-985.
- Fleischmajer, R., Perlsh, J.S. Capillary alterations in scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1980; 2: 161-170.
- Franke, Th., F., Yang, S-II, Chan, T.O., et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol-3kinase. *Cell*. 1995; 81: 727-736.
- Freshney, N.W., Rawlinson, a., Guedson, F. et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*. 1994; 78: 1039-1049.

- Freije, J.M., Diez-Itza, I., Balbin, M., et al Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 16766-16773.
- Fukuda, Y., Ishiazaki, M., Masuada, Y. The role of intra-alveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodelin in patients with diffuse alveolar damage. *Am. J. Pathol.* 1987; 126: 71-82.
- Fulmer, J.D., Crystal, R.G. En: *Current Pulmonology*. 1: 1979, Houghton Mifflin, Boston. Simmons D.H..
- Furie, B., Furie, B.C., The molecular basis of blood coagulation. *En: Hoggan, R. eds. Hematology: Basic principles and practice*. NY, Churchill Livingstone, 1991: 213-231.
- Furie, B., Furie, B.C. Mechanism of vitamin K dependent gamma-carboxylation. *Blood*. 1990; 75: 753-762.
- Gadeck, J.E., Kelman, J.A., Fells, G., Weinberger, S.E., Horwitz, A.L., Reynolds, H.Y., Fulmer, J.D., Crystal, R.G. Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1979; 301: 737-742.
- Gay, S., Jones, R.E., Huang, G., Gay, R.E. Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor and sis-oncogene expression in scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 1989; 92: 301-303.
- Gauldie, J., Jordana, M., Cox, G. Cytokine and pulmonary fibrosis. *Thorax*. 1993; 48: 931-935.
- Gerber, G., Altman, K.I. Studies on the metabolism of tissue proteins I. Turnover of collagen labeled with proline-U-C¹⁴ in young rats. *J. Biol. Chem.* 1960; 235: 2653-2656.
- Giald, A., Michael, R.P., Stewart, D.J., Sheppard, M., Corrin, B., Hamid, Q.A. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet*. 1993; 341: 1550-1554.
- Gibbons, G.H., Dzau, V.J. Endothelial function in vascular remodeling. *En: The endothelium: An introduction to current research*. J.B. Warren, editor, 1990: 81-93.
- Gilliard, N., Spragg, R.G. Oxidation of porcine lung surfactant results in alterations of function. *Clin. Res.* (abstract). 1990; 38: 158 A.
- Glenn, K.C., Carney, D.H., Fenton, J.W.II, Cunningham, D.D., Thrombin active site regions required for fibroblast receptor binding and initiation of cell division. *J. Biol. Chem.* 1980; 155: 6609-6616.
- Gmeiner, B., Leibl, H., Zenlauth, G., seelos, Ch. Affinity binding of distinct functional fibronetin domains to immobilized metal chelates. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 321: 40-42.
- Goldstein, R.H., Fine, A. Fibrotic reactions in the lung: the activation of the lung fibroblast. *Exp. Lung. Res.* 1986; 11: 254-261.
- Goldstein, R.H., Poliks, C.F., Pilch, P.F., Smith, B.D., Fine, A. Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human foetal lung fibroblasts. *Endocrinology*. 1989; 124: 964-970.
- Golub, T.R., Barker, G.F., Lovell, M., Guillard, A. Fusion of Platelet-Derived Growth Factor receptor β to a novel ets-like gene, tel, in chronic Myelomonocytic Leukemia with (5;12) Chromosomal translocation. *Cell*. 1994; 77: 307-316.
- Gospodarowicz, D., Ferrar, N., Sweigere, L., Neufeld, G. Structural characterization and biological functions of fibroblasts growth factor. *Endocrine Reviews*. 1987; 8: 95-114.
- Grant, M.E., Prockop, D.J. The biosynthesis of collagen. *N. Engl. J. Med.* 1972; 286: 242-249.

- Grant, M.E., Kefalides, N.A., Prockop, D.J. The biosynthesis of basement membrane collagen in embryonic chick lens: delay between the synthesis of polypeptide chains and secretion of collagen by matrix-free cells. *J. Biol. Chem.* 1972; 247; 3539-3544.
- Gray, A.J., Reeves, J.T., Harrison, N.K., Winlove, P., Laurent, G.J. Growth factors for human fibroblasts in the solute remaining after clot formation. *J. Cell Sci.* 1990; 96; 271-274.
- Grotendorst, G.R., Chang, H., Seppa, E.J., Kleinman K.H., Martin, G.R. Platelet-derived growth factor is chemotactic for vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 1982; 113; 261-266.
- Grotter, M.G., Priestle, J.P., Rahuel, J. et al. Crystal structure of the thrombin-hirudin complex : A novel mode of serine protease inhibition. *EMBO J.* 1990; 9; 2361-2365.
- Gu, J., Pinheiro, J.M., Yu, C.Z., D'Andrea, M., Murlidharan, S., Malik, A. Detection of endothelin-like immunoreactivity in epithelium and fibroblasts of the human umbilical cord. *Tissue. Cell.* 1991; 23; 437-444.
- Hakomens, P. Structure and organization of cell surface glycolipid dependency on cell growth and malignant transformation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1975; 417; 58-80.
- Hallman, M., Akino, T., Bry, K. Surfactant protein A, phosphatidylcholine, and surfactant inhibitors in epithelial lining fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144; 1376-1384.
- Han, R.N.N., Buch, S., Freeman, B.A., Post, M., Tanswell, A.K. Platelet-derived growth factor and growth related genes in rat lung. II. Effect of exposure to 85% O₂. *Am. J. Physiol.* 1992; 262; (Lung Cell Mol. Physiol.6) L140-L-146.
- Hartwing, J.H., Bokoch, G.M., Carpenter, Ch., et al. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncouple actin filament barbed ends through phosphoinositidase synthesis in permeabilized human platelets. *X1995; 82; 643-653.*
- Harris, E.D., Welgus, H.G., Krane, S.M. Regulation of the mammalian collagenases. *Collagen Rel. Res.* 1984; 4; 493-512.
- Harrison, N.K., Cambrey, A.D., Word, A., Southcott, A.M., Black, C.M., duBois, R.M., Laurent, G.J., McAnulty, R.J. Insuline-like growth factor-1 is partially responsible for fibroblast proliferation induced by bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis. *Clin. Sci.* 1994.
- Harrison, N.K., Laurent, G.J. Lung collagen metabolism: The link between inflammation and pulmonary fibrosis. *Er: Interstitial Pulmonary diseases: Selected topics.* Eds. Selman-Lama, M. and R. Barrios. CRC. Press. Boca de raton, Florida. 1991; 47-74.
- Harrison, N.K., Myers, A.R., Corrin, B., Soosay, G., Dewar, A., Black, C.M., duBois, R.M., Turner Warwick M. Structural features of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144; 706-713.
- Harrison, N.K., McAnulty, R.J., Haslam, P.L., Black, C.M., Laurent, G.J. Evidence for protein oedema, neutrophil influx, and enhanced collagen production in lungs of patients with systemic sclerosis. *Thorax.* 1990; 45; 606-610.
- Harrison, N.K., Glanville, A.R., Strickland, B., Haslam, P.L., Corrin, B., Addis, B.J., Lawrence, R., Millar, A.B., Black, C.M., Turner-Warwick, M. Pulmonary involvement in systemic sclerosis: the detection of early changes by thin section CT scan, bronchoalveolar lavage and ^{99m}Tc-DTPA clearance. *Respir. Med.* 1989; 83; 403-414.
- Harrison, N.K., Argent, A.C., McAnulty, R.J., Black, C.M., Corrin, B., Laurent, G.J. Collagen synthesis and degradation by systemic sclerosis lung fibroblasts: response to transforming growth factor. *Chest.* 1991; 99; 71s.

- Harrison, N.K., Laurent, G.J. Mechanisms for the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *En: Respiratory Medicine II*. Eds: Barnes, P.J. Butterworth Heinemann. U.K. 1995
- Haslam, P. L., Turton, C.W.G., Lukoszek, A., Salsbury, A.J., Dewar, A., Collins, J.V., Turner-Warwick, M. Bronchoalveolar lavage fluid cell counts in cryptogenic fibrosing alveolitis: their relation to therapy. *Thorax*. 1980; 35; 328-329.
- Hawkins. R.A., Claman, H.N., Clarck, R.A.F., Steigerwald, J.C. Increased dermal mast cell population in progressive systemic sclerosis: a link in chronic fibrosis. *Ann. Int. Med.* 1985. 102; 182-186.
- Heidin, C.H., Westermark, B.W. Signal transduction by the receptors for PDGF. *J. Cell. Sci.* 1990; 96; 193-196.
- Heidin, CH, Ostman A, Westermark, B. Structure of Platelet-Derived Growth Factor: Implications for functional properties. Growth Factors: Implications for functional properties. *Growth Factors*. 1993; 8: 245-252.
- Heidin, C.H., Westermark, B. Growth factors as transforming proteins. *Eur. J. Biochem.* 1989; 184: 487-496.
- Heidin, C.H., Westermark, B. Growth factors: mechanism and relation to oncogenes. *Cell*. 1984; 37: 9-20.
- Hernández-Rodríguez, N.A., Cambrey, A.D., Mcanulty, R.J., Chambers, R.C., duBois, R.M., Black, C.M., Scully, M.F., Laurent, G.J. Evidence that thrombin acts as a fibroblast growth factor in pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 149: A709.
- Hernández-Rodríguez, N.A., Cambrey, A.D., Harrison, N.K., Chambers, R.C., Gray, A.J., Southcott, A.M., duBois, R.M., Black, C.M., Scully, M.F., McAnulty, R.J., Laurent, G.J. Role of Thrombin in pulmonary fibrosis. *The Lancet*. 1995; 346: 1071-1073
- Hiroe, M., Hirata, Y., Marumo, F., Nagata, M., Toyozaki, T., Hasumi, M., Ohta, Y., Horie, T., Sekiguchi, M. Immunological localization of endothelin in human vascular endothelin cells. *Peptides*. 1989; 10; 1281-1282.
- Hoyt, D.G., Lazo, J.S. Early increase in pulmonary mRNA encoding procollagen and transforming growth factor- β in mice sensitive to cyclophosphamide-induced pulmonary fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989. 249:38-43.
- Hoyt, D.G., Lazo, J.S. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagen, fibronectin and transforming growth factor β precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 246; 765-771.
- Huang, J.S., Huang, S.S., Deuel, T.S. Human platelet-derived growth factor: radioimmunoassay and discovery of a specific plasma binding protein. *J. Cell. Biol.* 1983; 97; 383-388.
- Hunninghake, G.W., Gadek, J.E., Kawanami, O., Ferrans, V.J., Crystal, R.G. Maintenance of granuloma formation in p pulmonary sarcoidosis by T-lymphocytes within the lung. *N. Engl. J. Med.* 1980; 302: 594-600.
- Hunninghake, G.W., Hemken, C., Brady, M. Monick, M. Immune interferon is a growth factor for human lung fibroblasts. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986; 134; 1025-1028.
- Idell, S., Gonzalez, K., Bradford, H., MacArthur, L.K., Fein, A.M., Moulder, R.J., Garcia, G.J.M., Griffith, D.E., Weiland, J., Martin, Th.R., McClarty, J., Fair, D.S., Walsh, P.N., Colman R.W. Pro-coagulant activity in bronchoalveolar lavage in the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136:1466-1474.

- Ignatz, R.A., Endo, T., Messague, J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 6443-6446.
- Jackson, S.H., Heininger, J.A. A study of collagen reutilization using an $^{18}\text{O}_2$ labeling technique. *Clin. Chem. Acta.* 1974; 51: 163-171.
- Jeffries, A.L., Coates, G., O'Brodovitch, H. Pulmonary epithelial permeability in hyaline membrane disease. *N. Eng. J. Med.* 1984; 311: 1075-1080.
- Jimenez, S.A., Freundlich, B., Rosenbloom, J. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. *J. Clin. Invest.* 1984; 74: 1112-1116.
- Jordan, R.E., Costa, G.M., et al. The kinetic of hemostatic enzyme-ATIII interactions in the presence of low molecular weight heparin. *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 10081-10090.
- Jordana, M., Schulman, J., McSharry, C., Irving, L.B., Newhouse, T., Jordana, G., Gaudie, J. Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from controls and fibrotic tissue. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 137: 579-584.
- Kadler, V.M., Hojima, Y., Prockop, D.J. Collagen fibrils *in vitro* grow from pointed tips in the C-to -N terminal direction. *Biochem. J.* 1990; 268: 339-343.
- Kahaleh, M.B., LeRoy, E.C. Interleukin-2 in scleroderma - correlation of serum level with extent of skin involvement and disease duration. *Ann. Int. Med.* 1989; 110: 448-450.
- Kahaleh, M.B., LeRoy, E.C. Endothelial injury in scleroderma. *J. Exp. Med.* 1979; 149: 1326-1335.
- Kahaleh, M.B. Endothelin, and endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. *Arth. and Rheum.* 1991; 34: 978-983.
- Kahalil, N., Oconnor, R.N., Uruh, H.W., Warren, P.W., Flanders, K.C., Kemp, A., Bereznyay, O.H., Greenberg, A.H. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1991; 5: 155-162.
- Kahari, V.M., Multimaki, P., Vuorio, E. Elevated pro- $\alpha 2(1)$ collagen mRNA levels in cultured scleroderma fibroblasts: results from an increased transcription rate of the corresponding gene. *FEBS. Lett.* 1987; 215:331-334.
- Kane, W.H., Davies, E.W., Blood coagulation factors V and VIII: Structural and functional similarities and their relationship of hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood.* 1988; 71: 359-365.
- Kao, K.T., Hiler, DM., McGavack, T.H. Connective tissue V. Comparison of synthesis and turnover of collagen and elastin in tissues of rat at several ages. *Proc. Soc. Biol. Med.* 1961; 106: 335-338.
- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakolew, S.B., Sporn, M.B., Fauci, A.S. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 1037-1050.
- Kelley, J. Cytokines of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 141: 765-788.
- Kelley, J., Chrin, L., Shull, S., Rowe, D.W., Cutroneo, K.R. Bleomycin selectively elevates mRNA levels for procollagen and fibronectin following acute lung injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985; 131: 836-843.
- Keene, D.R. Enguail, E., Glenville, R.W. Ultrastructure of the type VI collagen in human skin and cartilage suggest anchoring function for this filamentous network. *J. Cell Biol.* 1988; 107: 1995-2006.

- Kettner, Ch., Shaw, E. D-Phe-Pro-Arg CH₂Cl A selective affinity label for thrombin. *Thrombosis Res.* 1979; 14: 969-973.
- Khalil, N., O'Connor, R.N., Unruh, H.W., Warren, P.W., Flanders, K.C., Kemp, A., Berezney, O.H., Greenberg, A.H. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor- β in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1991; 5: 155-162.
- Khalil, N., Berezney, O., Spom, M., Greenberg, A.H. Macrophage production of transforming growth factor β and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 727-737.
- King, R.J., Jones, M.B., Minoio, P. Regulation of lung cell proliferation by polipeptide growth factors. *Am. J. Physiol.* 1989; 257: L23-28.
- Kinsella, M.B., Smith, E.A., Miller, K.S., LeRoy, E.C., Silver, R.M. Spontaneous production of fibronectin by scleroderma alveolar macrophages. *Arthritis Rheum.* 1989; 32: 577-583.
- Kirk, J.M.E., Heard, B.E., Kerr, I. Turner-Warwick, M. Laurent, G.J. Quantification of types I and III collagen in biopsy lung samples from patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Collagen Rel. Res.* 1984; 4:169-182.
- Kirk, J.M.E., Da Costa, P.E., Turner-Warwick, M., Littlejohn, R.J., Laurent, G.J. Biochemical evidence for an increased and progressive deposition of collagen in the lungs of patients with pulmonary fibrosis. *Clin. Sci.* 1986; 70: 39-45.
- Kivirikko, K.I., Myllylä, R. Biosynthesis of the collagens. *En: Extracellular Matrix Biochemistry*. Edited by Piez, C.A. and, A.H. Elsevier, New York. 1984. pp. 83-118.
- Kivirikko, K. Collagen and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann. Med.* 1993; 25: 113-128.
- Kjellen, L., Lindahl, V. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 1991; 60: 443.
- Klaus, M.H., Clements, J.A., Havel, R.J. Composition of surface active material isolated from beef lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1961; 47: 1858-1859.
- Kohase, M., May, L.T., Tamm, I. *Mol. Cell Biol.* 1987; 7: 273-283
- Köhno, M., Yasunari, K., Yokokawa, K., Murakawa, K., Horio, T., Kanayama, Y., Fuzisawa, M., Inoue, T., Takeda, T. Thrombin stimulates the production of immunoreactive endothelin-1 in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Metabolism*, 1990; 39: 1003-1005.
- Komuro, J., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F., Yazaki, Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Letts.* 1988; 238: 249-251.
- Kom, J.H., Downie, E.J. *Cell. Physiol.* 1989; 141: 437-440.
- Kom, J.H. Sustrain heterogeneity in prostaglandin E2 synthesis of human dermal fibroblasts. differences in PGE2 sythetic capacity of substrains are not stimulus restricted. *Arthritis Rheum.* 1985; 28: 315-322.
- Koshland, D. Mitosis: Back to the basis. *Cell.* 1994; 77: 951-954.
- Kovacs, E.J., Kelley, J. Lymphokine regulation of macrophage-derived growth factor secretion following pulmonary injury. *Am. J. Pathol.* 1985; 121: 261-268.
- Kovacs, E.J., DiPietro, L.A. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994; 8: 854-861.

- Krujier, W., Cooper, J.A., Hunter, T., Verma, I.M. Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos and protein. *Nature*. 1984; 312; 711-716.
- Kulozik, M., Hogg, A., Lankat-Buttgereit, B., Krieg, T. Co-localization of transforming growth factor β 2 with α 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* 1990; 86; 917-922.
- Kumar, R.K., Bennet, R.A.; Brody, A.R: An enzyme immunoassay for platelet-derived growth factor (PDGF): Application to the measurement of macrophages-derived PDGF. *Prog. Leuk. Biol.* 1988; 8; 393-396.
- Kurata, S.I., Hata, R.I. Epidermal growth factor inhibits transcription of type I collagen genes and production of type I collagen in cultured skin fibroblasts in the presence or absence of L-ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *J. Biol. Chem.* 1991; 266; 9997-10003.
- Kurland, L.T., Hauser, W.A., Ferguson, R.H. Epidemiologic features of diffuse connective tissue disorders in Rochester, Minn., 1951 through 1967, with special reference to systemic lupus erythematosus. *Mayo Clin. Proc.* 1969; 44; 649-663.
- Laiho, M., Keski-Oja, J. Transforming growth factor- β as regulators of cellular growth and phenotype. *Crit. Rev. Oncogenesis*. 1992; 3; 1-26.
- Lasky, J.A., Coin, P.G., Lindroos, P.M., et al. Chrysotile asbestos stimulates PDGF-AA production by rat lung fibroblasts in vitro. Evidence for an autocrine loop. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 12; 162-170.
- Last, J.E., Siefkin, A.D., Reiser, K.M. Type I collagen content is increased in lungs of patients with adult respiratory distress syndrome. *Thorax*. 1983; 38; 364-368.
- Laurent, G.J., McAnulty, R.J., Cornin, B., Cockerill, P. Biochemical and histological changes in pulmonary fibrosis induced in rabbits with intratracheal bleomycin. *Eur. J. Clin. Invest.* 1981; 11; 441-448.
- Laurent, G.J., Harrison, N.K., McAnulty, R.J. The regulation of collagen production in normal lung and during interstitial lung disease. *Postgrad. Med. J.* 1988; 64; 26-30.
- Laurent, G.J. Lung collagen: more than scaffolding. *Thorax*. 1986; 41; 418-426.
- Laurent, G.J. Rates of collagen synthesis in the lung, skin, and muscle obtained *in vivo* by a simplified method using [3 H]proline. *Biochem. J.* 1982; 206; 535-544.
- Laurent, G.J., McAnulty, R.J. Protein metabolism during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rabbits. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983; 128; 82-88.
- Laurent, G.J., Bishop, J.E., Gray, A.J., Peacock, A., Harrison, N.K., Winlove, C.P., Lever, M.J., Reves, J.T. Deposition of arterial collagen in pulmonary hypertension. Putative role for growth factors derived from the circulation. *En: Progress in respiration Research*. Eds. Herget J. and Widimisky J. Basel Switzerland, 1990; 26; 54-62.
- Laurent, G.J., Coker, R.K., Mcanulty, R.J. TGF β antibodies: A novel treatment for pulmonary fibrosis. *Thorax*. 1993; 48; 953-954.
- Lawrence, D.A., Pircher, R., Kryceve-Martinerie, C., Julien, P. Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. *J. Cell. Physiol.* 1984; 121; 184-190.
- Lazenby, A.J., Crouch, E.C., McDonald, J.A., Kuhn, C. Remodeling of the lung in bleomycin-induced fibrosis in the rat: an immunohistochemical study of laminin, type IV collagen, and fibronectin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 142; 206-214.

- Lee, P., Norman, C.S., Sukenik, S. The clinical significance of coagulation abnormalities in systemic sclerosis (scleroderma). *J. Rheumatol.* 1985; 12; 514-517.
- Leof, E.B., Wharton, W., Van Wyk, J.J., Pledger, W.J. Epidermal growth factor (EGF) and Somatomedin C regulate G1 progression in competent BALB/c-3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 1982; 141; 107-115.
- Leof, E.B., Proper, J.A., Goustin, A.S., Shipley, G.D., DiCorleto, P.E., Moses, H.L. 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.* 1988; 83; 2453-2457.
- Léránt, T., Kovacs, T., Papp, B., Mandl J. et al. Interaction of thrombin with endothelial cells in presence of thrombin and α -2-macroglobulin. *Haematologia.* 1990; 23; 161-169.
- LeRoy, E.C. Sentinel signs and symptoms of systemic sclerosis. *Current Opinions Rheumatol.* 1988; 15; 202-205.
- Li, K., Sawamura, D., Giudice, G.J., Diaz, L.A., Mattei, M.G., Chu, M.L., Uitto, J. Genomic organization of collagenous domains and chromosomal assignment of human 180-KDa bullous pemphigoid antigen 2, a novel collagen of stratified squamous epithelium. *J. Biol. Chem.* 1991; 266; 24064-24069.
- Lindros, P.M., Coin, P., Osorio-Vargas, A.R., Bonner, J.C., Interleukin 1 β (11-1) α -2-Macroglobulin complex up-regulate the Platelet-Derived Growth Factor α -receptor on rat pulmonary fibroblasts. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1995; 13; 455-465.
- Liu, C.Y., Nossel, H.L., Kaplan, K.L. The binding of thrombin by fibrin. *J. Biol. Chem.* 1979; 254; 10421-10425.
- Lobb, R.R. Clinical applications of heparin binding growth factors. *Eur. J. Clin. Invest.* 1988; 18; 321-336.
- Low, R.B., Cutroneo, K.R., Davis, G.S., Giancia, M.S. Lavage type III procollagen N-terminal peptides in human pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Lab. Invest.* 1983; 48; 755-759.
- Madrí, J., Furthmar, H. Isolation and tissue localization of type AB2 collagen from normal lung parenchyma. *Am. J. Pathol.* 1979; 94; 323-330.
- Lyons, R.M., Moses, H.L. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur. J. Biochem.* 1990; 187; 467-473.
- Majewski, S., Hunzelman, N., Schirren, C.G., Mauch, C., Aumailley, M., Krieg, T. Increased adhesion of fibroblasts from patients with scleroderma to extracellular matrix component: in vitro modulation by IFN γ but not by TGF β . *J. Invest. Dermatol.* 1992; 98; 86-91.
- Madrí, J.A., Furthmayr, H. Isolation and tissue localization of type AB2 collagen from normal lung parenchyma. *Am. J. Pathol.* 1979; 94; 323-330.
- Marchant, J.K., Linsenmayer, T.F., Gordon, M.K. cDNA analysis of a cornea-specific collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88; 1560-1564.
- Marinelli, W.A., Pionovsky, V.A., Harmon, K.R., Bitterman, P.B. Role of Platelet-Derived Growth Factor in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Biol.* 1991; 5; 503-504
- Martin, G.R., Timpl, R., Müller, R.K., Kuhn, K. The genetically distinct collagens. *Trends Biochem. Sci.* 1985; 10; 265-287.
- Martinet, Y., Bitterman, P.B., Mornex, J.F., Grotendorst, G.R., Martin, G.R., Crystal, R.G. Activated human monocytes express the c-sis proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. *Nature.* 1986; 319; 156-160.

Martinet, Y., Rom, W.N., Grotendorst, G.R., Martin, G.R., Crystal, R.G. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Eng. J. Med.* 1987; 317: 202-209.

Matsull, T., Pierce, P.H., Fleming, T.P., Greenberg, J.S., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 8314-8318

Masaji, T., Springall, D.R. Distribution of endothelin-like immunoreactivity and mRNA in the developing and adult human lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1993; 4: 50-58.

Massague, J. The transforming growth factor β family. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1990; 6: 597-610.

Matrisian, L.M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends. Genet.* 1990; 6: 121-125.

Mattoli, S., Soloperto, M., Marini, M., Fasoli, A. Levels of endothelin in bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 1991; 88: 376-384.

Mattoli, S., Mezzeti, M., Riva, G., Allegra, L., Fasoli, A. Specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1990; 3: 145-151.

Mauviel, A., Redini, F., Hartmann, D.J., Pujol, J.P., Evans, C.H. Modulation of human dermal fibroblast extracellular matrix metabolism by the lymphokine leukoregulin. *J. Cell. Biol.* 1991; 113: 1455-1462.

Mays, P.K., McNulty, R.J., Laurent, G.J. Age-related changes in lung collagen metabolism: a role for degradation in regulating lung collagen production. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 140: 410-416.

Mays, P.K., Laurent, G.J. The regulation of collagen and elastin gene expression in normal lung and during pulmonary disease. *En: molecular biology of lung disease.* Edited by Barnes, P.J., Stockley, R.A., Blackwell scientific Publications, Oxford. 1992. pp. 156-170.

McAnulty, R.J., Campa, J.S., Cambrey, A.D., Laurent, G.J. The effect of transforming growth factor β on rates of procollagen synthesis and degradation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1991; 1091; 231-235.

McAnulty, R.J., Laurent, G.J. Collagen synthesis and degradation *in vivo*. Evidence for rapid rates of collagen turnover with extensive degradation of newly synthesized collagen in tissues of adult rat lung. *Collagen Rel. Res.* 1987; 7: 93-104.

McAnulty, R.J., Guerreiro, D., Cambrey, A.D., Laurent, G.J. Growth factor activity in the lung during compensatory growth after pneumonectomy: evidence of a role for IGF-1. *Eur. Respir. J.* 1992; 5: 739-747.

McAnulty, R.J., Laurent, G.J. Collagen and its regulation in pulmonary fibrosis. *EN: Lung Biology in Health and Disease: Pulmonary Fibrosis.* Eds. Phan S.H. and Thrall, R.S., Marcel Dekker, N.Y. 1995, pp.135-171.

McAnulty, R.J., Moores, S.R., Talbot, R.J., Bishop, J.E., Mays, P.K., Laurent, G.J. Long-term changes in mouse lung following inhalation of a fibrosis-inducing dose of $^{239}\text{PuO}_2$: changes in collagen synthesis and degradation rates. *Int. J. Radiat. Biol.* 1991; 59: 229-238

McAnulty, R.J., Chambers, R.C., Laurent, G.J. Regulation of fibroblast procollagen production. Transforming growth factor- β induces prostaglandin E_2 but not procollagen synthesis via a pertussis toxin sensitive G-protein. *Biochem. J.* 1995; 307: 63-68

- McAnulty, R.J., Laurent G.J. The pathogenesis of fibrosis and potential new therapeutic strategies. *Exp Nephrol.* 1995; 3: 96-107.
- McCarfey, M.W., Ross, C.A., Glaser, B.M., Snyder, S.H. Endothelin visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1989; 86: 7285-7289.
- McCoy, B.J., Diegelmann, R.F., Cohen, I.K. *In vitro* inhibition of cell growth, collagen synthesis, and prolyl hydroxylase activity by triamcinolone acetonide (40750). *Proc. soc. Exp. Biol. Med.* 1980; 163: 2166-222.
- McCumber, M.W., Ross, C.A., Glaser, B.M., Snyder, S.H. Endothelin: visualization of mRNA by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 7285-7289.
- McDonald, J.A., Broekelmann, T.J., Matheke, M.L., Crouch, E., Koo, M., Kuhn, C. A monoclonal antibody to the carboxyterminal domain of procollagen type I visualizes collagen synthesizing fibroblasts: detection of an altered fibroblast phenotype in lungs of patients with pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1986; 78: 1237-1244.
- Medsger, T.A., Masi, A.T., Rodnan, G.P., Benedek, T.G., Robinson, H. Survival with systemic sclerosis (scleroderma): a life table analysis of clinical and demographic factors in 309 patients. *Ann. Intern. Med.* 1971; 75: 368-376.
- Medsger, T.A. 1986. Comment on scleroderma criteria. Co-operative study. *En: Current topics in rheumatology systemic sclerosis (scleroderma).* Gower Medical Publishers, New York.
- Melvier, H., Junqua, S., Masse, R., Legendre, N., Lafuma, J. Pulmonary connective tissue modifications induced in rat by inhalation of ²³⁹PuO₂ aerosol. *En: Pulmonary toxicology of respirable particles*, edited by Sanders, C.L., Cross, F.T., Dagle, G.E., Mahaffey, J.A. Us DoE Technical Information Center, Oak Ridge, TN. 1980 pp. 392-402.
- Michet, C.J., McKenna, C.H., Elveback, L.R., Kaslow, R.A., Kurland, L.T. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota., 1950 through 1979. *Mayo. Clin. Proc.* 1985; 60: 105-113.
- Miller, E.J., Gay, S. The collagens: an overview and update. *Meth. Enzymol.* 1987; 144: 3-41.
- Miller, E.J., Gay, S. Collagen structure and function. *En: Wound healing: Biochemical and clinical aspects*, edited by Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J.W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. 1992. pp. 130-151.
- Ming, W.J., Bersoni, L., Montovani, A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 1987; 138: 1469-1474.
- Miyachi, T., Yanagisawa, M., Tomizawa, T., Sigishita, Y., Suzuki, N., Fujino, M., Ajisaka, R., Goto, K., Masaki, T. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet.* 1989; 21: 53-54.
- Molnar, J.A., alpert, N., Burke, J.F., Young, V.R. Synthesis and degradation rates of collagen in vivo in whole skin of rats, studied with ¹⁸O₂ labeling. *Biochem J.* 1988; 240: 431-435.
- Morelan, L.W., Goldsmith, K.W., Randall, J.W., Young, R.K., Garver, R.I. Transferring lung factor β within fibrotic scleroderma lung. *Am. J. Med.* 1992; 93: 628-636.
- Moses, H., Yang, E., and Pretenpol, J.A. TGF β stimulation and inhibition of cell proliferation. New mechanistic insights. *Cell* 1990; 6:254-247.
- Mossman, B.J., Gee, B.L. Asbestos related diseases. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320: 1721-1730.

- Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferative and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
- Muller, R. Bravo, J., Burckhardt, J., Currau, T. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*. 1984; 312: 716-720.
- Murphy, G., Docherty, J.P. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1992; 7: 120-125.
- Murray, J.C., Parkins, C.S.. Collagen metabolism in mouse lung after X-irradiation *Radiat. Res.* 1987; 111: 498-510.
- Murray, A. Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biol.* 1994;6: 872-876.
- Murray, A. Cyclin ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell.* 1995; 81: 149-153.
- Nagaoka, I., Trapnell, B.C., Crystal, R.G. Up-regulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1990; 92: 425-430.
- Nakamichi, K., Ihara, M., Kobayashi, M., Saeki, T., Ishikawa, K., Yano, M. Different distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary tissues revealed by the novel selective ligands BQ-123 and [Ala^{1,3,11,15}]ET-1. *Biochem. Biophys. Commun.* 1992; 182: 144-150.
- Nemerson, Y. Tissue factor and homeostasis. *Blood*. 1988; 71: 1- 17.
- Neuberger, A., Perrone, J.C., Slack, H.G.B. The relative metabolic inertia of tendon collagen in the rat. *Biochem. J.* 1951; 49: 199-204.
- Neuberger, a., Slac, H.B.J. The metabolism of collagen from liver, bone, skin and tendon in the normal rat. *Biochem. J.* 1953; 53: 47-52.
- Newport, J., Yan, H. an analysis of the regulation of DNA synthesis by cdk2, cip1 and licensing factor. *J. Cell. Biol.* 1995; 129: 1-15.
- O'Brien, R.F., Robbins, R.J., McMurty. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J. Cell Physiol.* 1987; 132: 263-270.
- O'Connell, M.J., Nurse, P. How cells know they are in G₁ or G₂. *Current Opinion in Cell Biol.* 1994; 6: 867-871.
- Oghiso, Y., Kubota, Y. Interleukin-1 production and accessory cell function of rat alveolar macrophages exposed to mineral dust particles. *Microbiol. Immunol.* 1987; 31: 275-283.
- Ohba, T., McDonald, J.K., Silver, R.M., Strange, Ch., LeRoy, E.C., Ludwicks, a. Scleroderma bronchoalveolar lavage fluid contains thrombin, a mediator of human lung fibroblast proliferation via induction of platelet-derived growth factor α -receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994; 10: 405-412.
- Oikarinen, J., Hatamochi, A., Crombrugge, B. Separate binding sites for nuclear factor 1 and CCAAT DNA binding factor in the mouse $\alpha 2(I)$ collagen promoter. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 11064-11070.
- Oliver, M.H., Harrison, N.K., Bishop, J.E., Cole, P.J., Laurent, G.J. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates application for assessment of growth factors. *J. Cell. Sci.* 1989; 92: 513-518.
- Olsen, A.S., Geddis, A.E., Prockop, D.J. High levels of expression of a minigene version of the human pro $\alpha 1(I)$ collagen gene in stably transfected mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 1117-1121

- Osomio-Vargas, A.R., Bonner, J.C., Baddgett, A., Brody, A.R. Rat alveolar macrophage-derived PDGF is chemotactic for rat lung fibroblast. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1990; 3: 595-602.
- Osomio-Vargas AR., Kalter, V.G., Badgett, A., Hernández-Rodríguez, N.A., Aguilar-Delfin, I., Brody, A.R. Early passage rat lung cell fibroblasts do not migrate in vitro to transforming growth factor- β . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1993; 8: 468-471.
- Osomio-Vargas, A.R., Seoane, m., Yañez, A. Enfermedad intersticial pulmonar asociada con la inhalación no ocupacional de polvos inorgánicos ambientales. *Rev. Invest. Clin.* 1986; 38; 59-83
- Osomio-Vargas, A.R., Hernández-Rodríguez, N.A., Yañez-Buruel, A.G., Essler, W., Obverby, L.H., Brody, A.R. Lung cell toxicity induced by a mixed dust from Mexicali Baja California, Mex. *Environ. Res.* 1991; 56: 31-47.
- Osomio-Vargas, A.R., Goodell, A.L., Hernández-Rodríguez, N.A., Brody, A.R., Coin, P.G., Badgett, A., Bonner, J. Platelet-derived growth factor (PDGF-AA, -BB and -AB) induces differential chemotaxis of rat lung fibroblasts and swiss 3T3 cells. *Am. J. Respir. Mol. Cell. Biol.* 1995; 12: 33-40.
- Overall, C.M., Wrana, J.L., Sodek, J. Independent regulation of collagenase, 72-KDa progelatinase and metalloproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 1860-1869.
- Palombella, V.J., Yamashiro, D.F., Maxfield, F.R., Decker, S., Vilker, J. Tumor necrosis factor increases the number of epidermal growth factor receptors on human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 1950-1954.
- Pan, T.C., Zhang, R.Z., Mateei, M.G., Timpl, R., Chu, M.L. Cloning and chromosomal location of human $\alpha 1(XVI)$ collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89; 6565-6569.
- Panettieri, R.A., Hall, I.P., Maki, Ch.S., Murray, R.K. α -thrombin increases cytosolic calcium and induced human airway smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1995; 13: 205-216.
- Pardo, A., Selman, M., Ramírez, R., Ramos, C., Montesaño, M., Sreticlin, G., Raghu, G. Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs. *Chest.* 1992; 102: 1085-1089.
- Peacock, A.J., Dawes, K.E., Shock, A., Gray, A.J., Reeves, J.T., Laurent, G.J. Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992; 7: 492-499.
- Peltonen, J., Palotie, A., Myalla, R., Kriegl, T., Olikarinen, A. Collagen biosynthesis in systemic sclerosis: regulation of post-translational modifications and synthesis of procollagen in cultured fibroblasts. *J. Invest. Rheumatol.* 1985; 84; 14-18.
- Peltonen, J., Kähäri, L., Jaakola, S., Kähäri, V.-M., Varga, J., Uitto, J., Jimenez, S.A. Evaluation of transforming growth factor β and type I procollagen gene expression in fibrotic skin diseases by in situ hybridization. *J. Invest. Dermatol.* 1990; 94; 365-371.
- Pencev, D., Grotendorst, G.R. Human peripheral blood monocytes secrete a unique form of PDGF. *Oncogenes Res.* 1988; 3; 333-342.
- Pennica, D., Hayfick, J.S., Bringham, T.S., Palladino, M.A., Goeddel, D.V. Cloning and expression in *Escherichia coli* of cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 82; 6060-6064.
- Penttinen, R.P., Kobayashi, S., Bornstein, P. Transforming growth factor β increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85; 1105-1108.

- Peppelenbusch, M.P., Qui, R.G., deVries-Smits, A.M., et al. Rac mediates growth factor-induced arachidonic acid release. *Cell*. 1995; 81: 849-856.
- Perlish, J.S., Lemich, G., Fleischmajer, R. Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol.* 1988; 90: 48-54.
- Phan, S.H., Thrall, R.S., Williams, C. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis: Effects of steroid on lung collagen metabolism. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1981; 124: 428-434.
- Phan, S.H. New strategies for treatment of pulmonary fibrosis. *Thorax*. 1995; 50: 415-421.
- Phillips, P.D., Pignolo, R.J., Christofalo, V.J. Insulin-like growth factor-1: specific binding to high and low affinity sites and mitogenic action throughout the life span of WI.38 cells. *J. Cell Physiol.* 1987; 133: 135-143.
- Pickrell, J.A., Harris, D.V., Pflieger, R.C., Benjamin, S.A., Belasich, J.J., Jones, R.K., McClellan, R.O. Biological alterations resulting from chronic lung irradiation II. Connective tissue alterations following inhalation of ¹⁴⁴Ce fused clay aerosol in beagle dogs. *Radiat. Res.* 1975; 63: 299-309.
- Pickrell, J.A., Harris, D.V., Benjamin, S.A., Cuddihy, R.G., Pflieger, R.C., Mauderly, J.L. Pulmonary collagen metabolism after lung injury from inhaled ⁶⁵Zn in fused clay particles. *Exp. Mol. Pathol.* 1978; 25: 70-81.
- Piguet, F., Collart, M.A., Grau, G.E., Sappino, A.-P., Vassalli, P. Requirement of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* 1990; 344: 245-247.
- Piguet, P.F., Collart, M.A., Grau, G.E., Kapanci, Y., Vassalli, P. Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 655-663.
- Pircher, R., Jullien P., Lawrence, D.A. β -Transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; 138: 30-34.
- Pledger, W.J., Stiles, C.D., Antoniades, H.N., Scher, D. An ordered sequence of events is required before BALB/c-3T3 cells become committed to DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74: 4481-4490.
- Popeone, E.A., Van Slyke, D.D. The formation of collagen hydroxyllysine. *J. Biol. Chem.* 1962; 237: 3491-3493.
- Postlethwaite, A.E., Seyer, J.M., Kang, A.H. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978; 75: 871-876.
- Postlethwaite, A.E., Snyderman, R., Kang, A.H. The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor. *J. Exp. Med.* 1976; 144: 1188-1191.
- Postlethwaite, A.E., Seyer, J.M. Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant tumor necrosis factor (TNF- α) and a synthetic TNF- α 31-68 peptide. *J. Exp. Med.* 1990; 172: 1749-1756.
- Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Balian, G., Kang, A.H. Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. Localization of the chemotactic region to a 140,000-molecular weight non-gelatin binding fragment. *J. Exp. Med.* 1981; 153: 494-499.
- Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L., Kang, A.H. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by TGF β . *J. Exp. Med.* 1987; 165: 251-256.
- Postlethwaite, A. E., Snyderman, R., Kang, A.H. Generation of a fibroblast chemoattracting factor in the serum by activation of complement. *J. Clin. Invest.* 1984; 82: 9-13.

- Potts, J.R., Campbell, L.D., Fibronectin structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biol.* 1994; 6: 648-655.
- Pouyssegur, J., Seuwen, K. Transmembranes receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annu. Rev. Physiol.* 1992; 54: 195-210.
- Price, W.A., Maats-Staats, B.M., Stiles, A.D. Insuline-like growth factor-1 (IGF-1) regulates IGFBP-4 by multiple mechanisms in A549 human adenoma cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 13: 466-476.
- Priestle, J.P., Rahuel, J., Rink, H. et al. Changes in interactions in complexes of hirudin derivatives and human α -thrombin due to different crystal forms. *Protein Structure.* 1993; 2: 1630-1642.
- Prockop, D.J., Kivirikko, K. Collagens. Molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Ann. Rev. Biochem.* 1995; 64: 403-434.
- Prockop, D.J. Mutations that alter the primary structure of type I collagen. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 15349-15352.
- Raghow, R., Lurie, S., Seyer, J.M., Kang, A.H. Profiles of steady state levels of messenger RNAs coding for type I procollagen, elastin, and fibronectin in hamster lungs undergoing bleomycin-induced interstitial pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 1733-1739.
- Raghow, R., Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L., Kang, A.H. Transforming growth factor β increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs post-transcriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 1987; 79: 1285-1288.
- Raghu, G., Masta, S., Meyers, D., Narayanan, A.S. Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor- β . *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 140: 95-100.
- Rao, C.D., Pech, M., Robbins, K.C., et al. The 5'untranslated sequence of the c-sis platelet-derived growth factor 2 transcript is a potent translational inhibitor. *Mol. Cell Biol.* 1988; 264: L-100-L106.
- Rapaport, S.I. The extrinsic pathway inhibitor: A regulator of tissue factor dependent blood coagulation. *Thromb. Haemost.* 1991; 66: 6-23.
- Read, J., Colebatch, H.J.H., Smith, K.V. Acute diffuse interstitial pulmonary fibrosis in scleroderma. *Austr. Ann. Med.* 1960; 9: 271-275.
- Reiser, K.M., Last, J.A. Pulmonary fibrosis in experimental acute respiratory disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1981; 123: 58-63.
- Rennard, S.I., Stier, L.E., Crystal, R.G. Intracellular degradation of newly synthesized collagen. *J. Invest. Dermatol.* 1982; 79: 775-825.
- Richards, R.J., Masek, L.C., Brown, R.F. Biochemical and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Toxicol. Pathol.* 1991; 19: 526-539.
- Richards, R.J., Morris, T.G. Collagen and mucopolysaccharides production in growing lung fibroblast exposed to chrysotile asbestos. *Life Sci.* 1990; 73: 441-456.
- Rifkin, D.B., Moscatelli, D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblasts growth factor. *J. Cell. Biol.* 1989; 109: 1-8.
- Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M. et al. Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 4167-4171.

- Roberts, H.R., Lozier, J.N. Nuevas perspectivas sobre la cascada de la coagulación. *Hospital Practice*. 1993; 2: 150-160.
- Robinson, B.W.S., Mclemere, T., Crystal, R.G. γ -interferon's spontaneously released by alveolar macrophages and T-lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* 1985; 75: 1488.
- Robinson, D.S., Durham, S.R., Kay, A.B. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1993; 48: 845-853.
- Rodnan, G.P., Lipsonski, I., Luksic, J. Skin collagen content in progressive systemic sclerosis (scleroderma) and localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1979; 22: 130-140.
- Rojas-Valencia, L., Montiel, F., Montaño M, Selman, M. Expression of a 2.8-Kb PDGF-B/c-sis transcript and synthesis of PDGF-like protein by human lung fibroblast. *CHEST* 1995; 108: 240-245.
- Rola-Pleszczynski, M., Lieu, H., Hamiel, J., Lemaire, I. Stimulated human lymphocytes produce a soluble factor which inhibits fibroblast migration. *Cell. Immunol.* 1982; 74: 1484-1487.
- Rom, W.N., Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Cantin, A., Crystal, R.G. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of non-smoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136: 1429-1434.
- Rom, W.N., Basset, P., Fells, G.A., Nukiwa, T., Trapnell, B.C., Crystal, R.G. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule. *J. Clin. Invest.* 1988; 82: 1665-1693.
- Rom, W.N., Travis, W.D., Brody, A.R. Cellular and molecular basis of the asbestos-related diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143: 408-422.
- Rorsman, F., Bywater, M., Knott, T.J., Scott, J., Bethsholtz, Ch. Structural characterization of the human Platelet-derived growth factor A-chain cDNA and gene: Alternative exon usage predicts two different precursor proteins. *Mol. Cell Biol.* 1988; 8(2): 571-577.
- Ross, R., Raines, E.W., Bowen-Pope, D.F. The biology of platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1990; B327: 155-169.
- Rosenberg, R.D., Regulation of the homeostatic mechanism. *EN: Stamatoyannopoulos, G. eds. Molecular Basis of Blood Diseases.* Philadelphia, WB Saunders. 1987: 534-574.]
- Rossi, G.A., Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Ferrans, V.J., Crystal R.G. Evidence for cronic inflammation as a component of the interstitial lung diseases associated with progressive systemic sclerosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985; 131: 612-617.
- Saeki, T., Ihara, M., Fukuroda, T., Yamagiwa, M., Yano, M. [Ala^{1-3,11,15}] endothelin-1 analogs with ET_B agonistic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 179: 286-292.
- Saltini, C., Spurzem, J.R., Lee, J.L., Pinkston, P., Crystal, R.G. Spontaneous release of interleukine-2 by T-lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis in primarily from the leu3+ DR+ T cell subtype. *J. Clin. Invest.* 1988; 77: 1962-
- Saltzman, L.E., Moss, J., Berg, R.A., Hom, B., Crystal, R.G. Modulation of collagen production by fibroblasts: Effect of chronic exposure to agonists that increases intracellular cyclic AMP. *Biochem. J.* 1982; 204: 25-30.
- Sandell, L.J., Boyd, C.D. Conserved and divergent sequence and functional elements within collagen genes. *En: Extracellular matrix genes.* edited by Sandell, L.J., and Boyd, C.D. Academic Press INC. San Diego 1990. pp. 1-56
- Santana, A., Saxena, B., Noble, N., Gold, C., Marshal, B. Increased expression of TGF β isoforms (β 1, β 2, β 3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 13: 34-44.

- Sara, V.R., Hall, K. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Rev.* 1990; 70: 591-614.
- Sato, N., Miyajima, A. Multimeric cytokine receptors: comun versus specific functions. *Current Opinion in Cell Biol.* 1994; 6: 174-179.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994; 370: 61-65.
- Scadding, J.G., Mitchell, D.M. Sarcoidosis, 2nd ed. Chapman and Hall. Londres. 1985.
- Scharfetter, K., Lankat, Buttgereit, B., Kreig, T. Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in situ hybridization. *Eur. J. Clin. Invest.* 1988; 18: 9-17.
- Schini, V.B., Hendrickson, H., Heublein, D.M., Burnett, J.C., Vanhoutte, P.M. Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 165: 333-334.
- Schreiber, A.B., Winkler, M.E., Derynck, R. Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science.* 1986; 232: 1250-1253.
- Schwartz, S. Serum-derived growth factor is thrombin?. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 4.
- Seeger, W., Stohr, G., Wolf, H.R.D., Neuhof, H. Alterations of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J. Appl. Physiol.* 1985; 58: 328-338.
- Segani, P.R. A system of transforming growth factor- β receptors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1991; 4: 395-396.
- Selman, M., Montano, M., Ramos, C., Chapela, R. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 1986; 41: 355-359.
- Selamn, M., Pardo, A., Barquin, N., Sansores, R., Ramirez R., et al. Collagenase and collagenase inhibitors in bronchoalveolar lavage fluids. *Chest* 1991; 100: 151-155.
- Senior, R.M., Skogan, W.F., Griffin, G.L., Wilner, G.D. Effects of fibrinogen derivatives upon the inflammatory response. *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 1014-1019.
- Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S., Schiffman, E.J., Martin, G.R. Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 1982; 92: 584-588.
- Seyer, J.M., Hutcheson, E.T., Kang, A.H. Collagen polymorphism in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1976; 57: 1489-1507.
- Sherry, B., Cerami, A. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine and autocrine control of inflammatory responses. *J. Cell Biol.* 1988; 107: 1269-1277.
- Shahzedi, S., Samstrand, B., Jeffrey, P.K., McAnulty, R.J., Laurent, G.J. Oral N-acetylcysteine reduces bleomycin-collagen deposition in the lungs of mice. *Eur. J. Cell Biol.* 1991; 4: 845-852.
- Shahzedi, S., Mulier, B., McAnulty, R.J., de Crombrugge, B., Jeffrey, P.K., Laurent, G.J. Enhanced type III collagen gene expression during bleomycin induced lung fibrosis. *Thorax* 1992; En prensa.
- Shaw, L.M., Olsen, B.R. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *TIBS.* 1991; 16: 191-194.
- de Shazo, R.D., Current concepts about the pathogenesis of silicosis and asbestosis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 1982; 70: 41-53

- Sherwin, R.P., Barman, M.L., Abraham, J.L. Silicate pneumoconiosis of farm workers. *Lab. Invest.* 1979; 40: 576-582.
- Shi, D.L., Savona, C., Gagnon, J., Cochet, C., Chambaz, E.M., Felge, J.J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of alpha 2 -macroglobulin by cultured bovine adenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 2881-2887.
- Shimasaki, S., Shimonaka, M., Zhang, H.-P., Ling, N. Identification of five different inosine like-growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 10646-10653.
- Shimokado, K., Raines, E.W., Madtes, D.K., Barrett, T.B., Beneditt, E.P., Ross, R. A significant part of the macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell.* 1985; 43: 277-286.
- Singh, J.P., Adams, L.D., Bonin, P.D. Mode of fibroblast growth enhancement by human interleukin-1. *J. Cell. Biol.* 1988; 106: 813-819.
- Silver, R.M., LeRoy, E.C. Systemic sclerosis (scleroderma) Immunological Diseases. 1988: Little Brown Co.
- Simonson, M.S., Wann, S., Mene, P., Dubyak, G.R., Kester, M., Nakazato, Y., Sedor, J.R., Dunn, M.J. Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 1990; 83: 708-712.
- Snick, J.V. Interleukin-6: an overview. *Ann. Rev. Immunol.* 1990; 8: 1392-1400.
- Springall, D.R., Howarth, P.H., Counihan, H., Djukanovic, R., Holgate, S.T., Polak, J.M. Endothelin immunoreactivity of airway epithelium in asthmatic patients. *Lancet.* 1991; 337: 697-701.
- Steen, V.D., Medsger, T.A. Jr. Epidemiology and natural history of systemic sclerosis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 1990; 16 (1): 1-10.
- Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J., Pledger, W.J. Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 1279-1283.
- Stiles, C.D., D'Ercole, A.J. The inosine-like growth factors in the lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1990; 3: 93-100.
- Stuart, A.F., Habershaw, J.A., Davison, E.A. "Phagocytes in vitro" *EN: Handbook of experimental immunology.* Weir, D.W. 3rd ed. Blackwell Sci. Publishers. London, 1978. pp.331.
- Sugaman, B.-J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Paladino, M.A., Shepard, H.M. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects and proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science.* 1985; 230: 943-943.
- Taipale, J., Koli, K., Keski-Oja, J. Release of transforming growth factor- β 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 25378-25384.
- Takuwa, N., Takuwa, Y., Yanagisawa, M., Yamashita, K., Masaki, T. A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 7856-7861.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubschen, S., Hirano, H., et al. Cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β *Nature*, 1993; 361: 79-82.

- Tani, K., Yasuoka, S., Ogushi, F., Asada, K., Fujisawa, K., Ozaki, T., Sano, K., and Ogura, T. Thrombin enhances lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1991; 5: 34-40.
- Tani, K., Yasuoka, S., Ogushi, F., Asada, K., Fujisawa, K., Ozaki, T., Sano, N., Ogura, T. Cytotoxic factor for fibroblasts in bronchoalveolar lavage fluid from bleomycin-treated rats. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1990; 5: 37-39.
- Thuesen, D.O., Speck, L.S., Lett-Brown, M.A., Grant, J.A. Histamine-releasing activity (HRA), I: production by mitogen or antigen-stimulated human mononuclear cells. *Immunol.* 1979; 123: 626-632.
- Thomas, P.D., Hunninghake, G.W. Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1987; 137: 747-754.
- Thomas, J.T., Cresswell, C.J., Rash, B., Nicolai, H., Jones, T., Solomon, E., Grant, M.E., Boot-Handford, R.P. The human collagen X gene. *Biochem. J.* 1991; 280: 617-623.
- Tierney, D.F., Johnson, R.P. Altered surface tension of lung extracts and lung mechanics. *J. Appl. Physiol.* 1965; 20: 1253-1260.
- Timpl, R., Wilderdorn, H., Van Deiden, V., Furthmayr, H., Kuhn, A. Network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur. J. Biochem.* 1981; 120: 203-211.
- Togari, H., Hashimoto, Y., Wada, Y., Hayakawa, T. Increased type III(I) collagen and $\alpha 1(I)\alpha 2(I)$ chain in a bronchopulmonary dysplastic lung. *Acta Paediatr. Jap.* 1993; 35: 101-107.
- Trojanowski, M., Wu, L., LeRoy, EC. Elevated expression of c-myc proto-oncogene in scleroderma fibroblasts. *Oncogene.* 1988; 3: 477-480.
- Tsukamoto, Y., Heisel, W.E., Wahl, S. Macrophage production of fibronectin a chemoattractant for fibroblasts. *J. Immunol.* 1981; 127: 673-678.
- Tominaga, S., Lengyel, P. β -interferon alters the pattern of proteins secreted from quiescent and platelet-derived growth factor-treated BALB/c-3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 1975-1978.
- Tsukamoto, Y., Heisel, W.E., Wahl, S. Macrophage production of fibronectin: a chemoattractant for fibroblast. *J. Immunol.* 1981; 127: 673-678.
- Van der Rest, M., Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB. J.* 1991; 5: 2814-2823.
- Van Vyve Th., Chanez, P., Bernard, A., et al Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J. Allergy. Clin. Immunol* 1995; 95: 60-68
- Varga, J., Rosenbloom, J., and Jimenez, S.A. Transforming growth factor- β (TGF β) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type II collagen and fibronectin mRNA in normal human dermal fibroblasts. *Biochem. J.* 1987; 247: 597-604.
- Varga J., Jimenez, S.A. Stimulation of normal human fibroblasts collagen production and processing by transforming growth factor- β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; 138: 974-980.
- Vignaud, J.M., Allam, M., Martinet, N., Pech, M., Plenat, F., Martinet, Y. Presence of platelet-derived growth factor in normal and fibrotic lung is specifically associated with intestinal macrophages, while both interstitial macrophages and alveolar epithelial cells express c-sis proto-oncogene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1991; 5: 531-538.
- Vlcek, J., Palombella, V.J., Hennksen-DeStefano, D., Swenson, C., Feinman, R., Hian, M., Tsujimoto, M. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 632-643.

- Vitto, J., Chu, M.L. Regulation of collagen gene expression in human skin fibroblasts and its alterations in diseases. *EN : Collagen Vol. IV. Molecular Biology*. Bjorn R. Olsen, Nimini, M. CRC Press, 1989, USA. pp. 109-124.:
- Vouret, C.V., Van, O.S.E., Rasmussen, U.B., Paviriani, A., Lecocq, J.P., Pouyssegur, J. Synthetic alpha-thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis. *Mol. Biol. Cell*. 1992; 3: 95-102.
- Vu, T.K., Wheaton, V.I., Hung, D.T., Charo, I., Coughlin, S.R., Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*. 1991;353: 674-677.
- Vuorio, T., Makela, J.K., Vuorio, E. Activation of type I collagen genes in cultured scleroderma fibroblasts. *J. Cell Biochem*. 1985; 28: 105-113.
- Vuorio, E., de Cromburghe, B. The family of collagen genes. *Annu. Rev. Biochem*. 1990; 59: 837-872.
- Vygly, M., Ollier-Hartmann, M.P., Lavigne, M., et al. Specific binding of basic fibroblast growth factor to basement membrane like structures and to purified heparan sulfate proteoglycan of the EHS tumor. *J. Cell. Physiol*. 1988; 137: 321-326.
- Wahl, S.M., Gately, C.L. Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T cell and continuous T cell line origin. *J. Immunol*. 1983; 130: 1226-1230.
- Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wakefield, L.M. Transforming growth factor type-beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987; 84: 5788-5792.
- Walker, L.N., Bowen-Pope, D.F., Ross, R., Reidy, M.A. Production of platelet-derived growth factor-like molecule by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83: 7311-7315.
- Walking, C., Freedman, R.B., Law, M.P., Biosynthesis and degradation of collagen in X-irradiated mouse lung. *Radiat. Res*. 1987; 112: 341-350.
- Weinstein, I.B. Protein kinase, phospholipid and control of growth. *Nature*. 1994; 301: 750.
- Wahl, S.M., Wahl, L.M., McCarthy, J.B. Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. *J. Immunol*. 1978; 121: 942- 946.
- Wahl, S.M. Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: A cause and a cure. *J. Clin. Immunol*. 1992; 12: 61-74.
- Wallaert, B., Bart, F., Aerts, C., Ouassii, A., Hartoon, P.Y., Tonnel, a.B., Voisin, C. Activated alveolar macrophages in subclinical pulmonary inflammation in collagen vascular diseases. *Thorax*. 1988 43: 24-30.
- Webb, D.J., Crookston, K.P., Hall, S.W., Gonia, S.L. Binding of transforming growth factor- β 1 to immobilized human α 2-macroglobulin. *Archives Biochem. Biophys*. 1992; 292: 487-492.
- Weiss, R.H., Nuccitelli, R. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents thrombin-induced mitogenesis, but not intracellular free calcium release, in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem*. 1992; 267: 5608-5613.
- Wharton, W., VanWyk, J.J., Pledger, W.J. Inhibition of BALB/c.3T3 cells late in G1: Commitment to DNA synthesis controlled by somatomedin C. *J. Cell Physiol*. 1982; 197: 31-39.
- Wiedlocha, A., Faines, P., Madhus, I.H., Sanding, K., Olmes, S. Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell*. 1994; 76: 1039-1051.

- Williamson, M. P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 1994; 297: 249-260.
- Wilkie, A.O.M., Morris-Kay, G.M., Jones, E.Y., Heath, J.K. Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Current Biol.* 1995; 52: 500-507.
- Woessner, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991; 5: 2145-2154.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentell, a., Doody, J. TGF β signals a heterotrimeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992; 71: 1003-1014.
- Wrann, M., Fox, C.F., Ross, R. Modulation of epidermal growth factor receptors on 3T3 cells by platelet-derived growth factor. *Science.* 1980; 210: 1363-1365.
- Wright, T.N., Allison, R.P., Mecham, e. Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.* 1984. Academic Press. pp. 256.
- Yamada, Y., Avedimento, V.E., Mudryj, M., Ohkubo, H., Vogeli, G., Irani, M., Pastan, I., de Crombrugge, B. The collagen gene: evidence for its evolutionary assembly by amplification of a DNA segment containing an exon of 54bp. *Cell.* 1980; 22: 887-892.
- Yamaguchi, Y., Mann, D., Ruoslahti, E. Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990; 348: 281-284.
- Yamane, K., Kashiwagi, H., Suzuki, N., Miyauchi, T., Yanagisawa, M., Goto, K., Masaki, T. Elevated plasma levels of endothelin-1 in systemic sclerosis. *Arthr. Rheum.* 1990; 34: 243-244.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomboe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988; 332: 411-415.
- Yamakage, A., Kikuchi, K., Smith, E.A., LeRoy, E.C., Tojanswski, M. Selective regulation of PDGF α receptors by TGF β in scleroderma fibroblasts. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 1227-1234.
- Yoshioka, M., Morita, H., Kurihara, H., Oh-hashii, M., et al. Regulatory effects of macrophage-derived cytokines and polymorphonuclear leukocytes on endothelin production and its metabolism. *J. Vasc. Med. Biol.* 1991; 2: 177-180.
- Yoshizumi, M., Mortia, T., Kurihara, H., Oh-hashii, M., Yanagisawa, A., Inoue, T., Masaki, T., Yasaki, Y. Regulatory effects of macrophage-derived cytokines and polymorphonuclear leukocytes on endothelin production and its metabolism. *J. Vas. Med. Biol.* 1991; 2: 177-180.
- Yurchenco, P.D. Furthmayer, H. Self-assembly of basement membrane collagen. *Biochemistry.* 1984; 23: 1839-1850.
- Zamora, M.R., O'Brien, R.F., Rutherford, R.B., Weil, J.V. Serum endothelin-1 concentrations and cold procogulation in primary Raynaud's phenomenon. *Lancet.* 1990; 336: 1144-1147.
- Zapol, W.M., Treilstad, R.L., Coffey, J.W., Tsai, I., Salvador, R.A. Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1979; 119: 547-554.
- Zeballos, G.A., Shaojian, A., Wu, J.M. Endothelin-1 secretion by human fibroblasts in culture: effects of cell density and IFN- β . *Biochem. Internal.* 1991; 25: 845-852

ANEXO

PAGINACION VARIA

COMPLETA LA INFORMACION

mutants. Our findings support the hypothesis of defective folate metabolism in at least a subset of mothers with NTD offspring.¹⁴ The genotypes of the mother and of the father contribute to the risk of having a child with spina bifida. Since folate administration may overcome the effects of reduced MTHFR activity, our findings provide a mechanism for the protective role of folate in the aetiology of spina bifida in individuals homozygous for the 677C→T mutation.

We thank Mr C Poot, Dr C Thomas, Mr M Segers, Ms de Graaf-Hess, Ms M de Priele-Poiboff, Mr E Stevens, and Ms H van Lath-Zanders for support. This study was supported by a grant no 91-1101 from the Beatrix Fonds, the Netherlands.

References

- 1 MCR Vitamin study research group. Prevention of neural-tube defects: results of the Medical Research Council vitamin study. *Lancet* 1991; **338**: 131-37.
- 2 Crozier M, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; **327**: 1832-35.
- 3 Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk-factor for neural-tube defects? *Neurology* 1994; **43**: 1475-80.
- 4 Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995; **345**: 149-51.
- 5 Kang S-S, Wong PWS, Susmano A, Sora J, Norosis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited

- risk-factor for cranial artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 936-45.
- 6 Engelen AAMT, Freeman DG, Boers GHJ, Stevens EAH, Trijbels FJM, Blom HJ. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1993; **54**: 142-50.
 - 7 Goveite P, Sumner JS, Milos R, et al. Human 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet* 1993; **4**: 193-5.
 - 8 Frost P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk-factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995; **10**: 111-13.
 - 9 Heuer den B, Blom HJ, Gerrits WBJ, et al. Is hyperhomocysteinemia a risk-factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 1995; **345**: 802-85.
 - 10 Terwiel-Poiboff MFWB, Van Den Berg M, Franken DG, et al. Three different methods for the determination of total homocysteine in plasma. *Int Clin Biochem* 1995; **12**: 213-20.

Departments of Pediatrics (J M J van der Put MD), Prof J M Trijbels MD, L P van den Heuvel PhD, H J Blom MD, **Obstetrics and Gynecology** (R P M Steegers-Theunissen MD), **Teratology and Epidemiology** (R P M Steegers-Theunissen MD), **Human Genetics** (C M Mariman MD), **University Hospital Nijmegen**; **Department of Hematology, Municipal Hospital Leyenburg**, The Hague (J den Heijer MD, Netherlands); and **Departments of Human Genetics, Pediatrics, and Biology** (McGill University, Montreal, Canada) (P Frosst MD, R Bozen PhD).

Correspondence to: Dr Honk J Blom, Department of Pediatrics, University Hospital Nijmegen, PC Box 9101, 6500 HB Nijmegen, Netherlands.

Role of thrombin in pulmonary fibrosis

Norma A. Hernández-Rodríguez, Alison D Cambrey, Nicholas K Harrison, Rachel C Chambers, Andrew J Gray, Anne M Southcott, Roland M duBois, Carol M Black, Michael F Scully, Robin J McAnulty, Geoffrey J Laurent

Pulmonary fibrosis commonly develops in systemic sclerosis. We assessed the role of thrombin in promoting fibroblast proliferation in the lungs in this disorder. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) thrombin concentrations were higher in ten patients with systemic sclerosis than in 12 healthy controls (1.65 vs 3.3 nmol/L, $p < 0.02$), but values in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis ($n=10$) or sarcoidosis ($n=10$) were not increased. BALF from all patients induced fibroblast proliferation. This proliferation was attenuated by thrombin inhibitors for BALF from systemic sclerosis patients only. We suggest thrombin contributes to lung fibroblast proliferation in this disorder.

Lancet 1995; **346**: 1071-73

Systemic sclerosis is a multisystem disease; a major characteristic is the uncontrolled deposition of extracellular matrix components in the skin and internal organs. The lungs are involved in most patients, and pulmonary fibrosis is a common cause of death.¹ One hypothesis for the pathogenesis is that after endothelial injury, bloodborne mediators or their precursors move from the circulation into adjacent tissues and activate fibroblasts to proliferate or produce excess extracellular matrix.^{2,3} One candidate mediator is thrombin, a key enzyme in the coagulation cascade, which is also a potent mitogen and chemoattractant for fibroblasts.^{4,5}

To investigate the role of thrombin in promoting fibroblast proliferation in the lungs, we measured thrombin concentrations in bronchoalveolar lavage fluid

(BALF) from patients with systemic sclerosis, healthy controls, and two other groups of patients with pulmonary fibrosis—cryptogenic fibrosing alveolitis and sarcoidosis. The contribution of thrombin to BALF-induced fibroblast proliferation was assessed with specific inhibitors of thrombin activity, hirudin, and BPACK (D-phenylalanine-proline-arginine-methylchloride), which block the catalytic site.

We studied ten patients with systemic sclerosis (with no clinical evidence of pulmonary hypertension), ten with cryptogenic fibrosing alveolitis, ten with sarcoidosis, and 12 healthy volunteers. BALF from bronchoalveolar lavage was centrifuged, and the cell-free supernatant concentrated ten-fold by ultrafiltration. Thrombin was measured spectrophotometrically.

Cell proliferation was assessed in human fetal and adult lung fibroblasts by rapid spectrophotometric assay. Cells were seeded (8×10^4 per well) in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 0.4% newborn calf serum. After 24 h incubation at 37°C in humidified air with 10% carbon dioxide, the medium from each well was replaced with fresh medium containing thrombin concentrations between 1 in 10 and 1 in 128 or purified human α -thrombin at concentrations up to 1 nmol/L. Fibroblasts exposed to medium plus newborn calf serum alone were used as controls. Optimum concentrations of thrombin inhibitors hirudin (1 nmol/L, BPACK 5 pmol/L) were preincubated with BALF or thrombin for 20 min before addition to cells. Changes in cell number were assessed 48 h later. Results were expressed as percentage change in mean absorbance compared with control medium plus serum only. Important results were confirmed by direct cell counting.

Group data are expressed as median and range. Initial statistical analysis was by non-parametric one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis test). If this test suggested that the groups were not derived from populations with the same median, two-sample Mann-Whitney tests (unless stated otherwise) were used to identify differences. The effects of thrombin and inhibitors on fibroblast proliferation were compared by a two-tailed

Thrombin concentrations in BALF were higher than the highest control value in all the systemic sclerosis patients (figure 1); this median value was four-fold greater than that in controls ($p < 0.02$). When expressed with respect to albumin the difference was two-fold ($p < 0.02$).

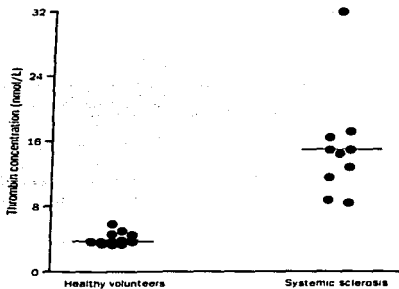


Figure 1: Thrombin concentrations in BALF from patients with systemic sclerosis and from healthy volunteers. Bar=median.

[2.4-42.5] vs 5.8 [1.6-10.1] nmol per mg albumin; $p < 0.02$). By contrast, thrombin concentrations in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (0.9 [0.4-4.6] nmol/L; 1.13 [0.6-3.6] nmol per mg albumin) or sarcoidosis (1.9 [0.6-9.0] nmol/L; 0.7 [0.3-2.2] nmol per mg albumin) were not increased compared with those in healthy volunteers.

Thrombin stimulated proliferation of human lung fibroblast lines at concentrations as low as 0.25 pmol/L with mean stimulation of 9.6 (SEM 0.4)% and 26.7 (0.8)% in fetal and adult lung fibroblasts ($p < 0.01$ for both). These effects were concentration dependent, with a maximum stimulation at 100 pmol/L for both cell lines (fetal 55.2 [0.4]%; adult 56.3 [1.7]%; $p < 0.001$).

BALF from all patients with systemic sclerosis stimulated proliferation of lung fibroblasts. For fetal lung fibroblasts a 1 in 16 dilution of BALF produced median stimulation of 49.7% (17.1-83.8%, $p < 0.02$). Mitogenic activity decreased as BALF was diluted; and at a dilution of 1 in 128, was not significantly different from that of the medium control. By contrast, BALF from normal volunteers did not stimulate fibroblast proliferation significantly (2-3% [-6.1 to 10.9]). The pattern of activity with adult lung fibroblasts was similar, although the maximum stimulation obtained was lower (29.3% [17.1-36.0], $p < 0.02$). BALF from patients with cryptogenic fibrosing alveolitis and sarcoidosis also stimulated proliferation of fetal lung fibroblasts; the median stimulation with a 1 in 16 dilution was 26.8% (0.7-79.4) and 45.5% (0-71.6), respectively ($p < 0.05$ for both).

Hirudin and PPACK inhibited the proliferative response to thrombin (0.1 nmol/L) by about 85% and 93% respectively in adult fibroblasts and by 75% and 62%, respectively, in fetal fibroblasts ($p < 0.001$ for all). Neither inhibitor alone affected fibroblast proliferation. Hirudin reduced fibroblast proliferation induced by systemic sclerosis BALF in all lavage samples by between 19% and 99% (median 75.6%; $p < 0.01$ Wilcoxon signed-rank test; figure 2). Similar results were obtained with

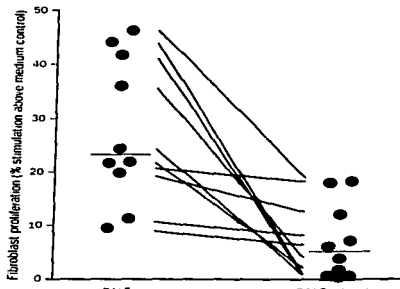


Figure 2: Effect of hirudin on fibroblast proliferation stimulated by BALF from patients with systemic sclerosis. Points=mean of six replicate cultures of fetal fibroblasts exposed to BALF at 1 in 64 dilution, with or without hirudin (5 nmol/L).

PPACK (median inhibition 0.1-0 [37-98]%; $p < 0.01$). Hirudin and PPACK did not affect fibroblast proliferation induced by BALF from the other groups of patients.

There was a highly significant correlation between mitogenic activity of BALF from patients with systemic sclerosis and the thrombin concentration per L or per mg albumin ($r = 0.72$, $p < 0.02$; $r = 0.71$, $p < 0.02$).

Higher than normal concentrations of thrombin in BALF from patients with systemic sclerosis may be due to endothelial cell injury, allowing passage of prothrombin or thrombin into the lung. Such injury is an early event in systemic sclerosis and is associated with an increased flux of proteins from the circulation.⁶

BALF from patients with pulmonary fibrosis stimulated fibroblast proliferation in comparison with BALF from normal controls. An increase in fibroblast numbers is characteristic of pulmonary fibrosis, and platelet-derived growth factor,⁷ endothelin-1,⁸ and insulin-like growth factor 1⁹ have been implicated. We have shown that thrombin also contributes to this activity. BALF from patients with cryptogenic fibrosing alveolitis and sarcoidosis also stimulated fibroblast proliferation but thrombin concentrations were low and thrombin inhibitors had no significant effect, which suggests that thrombin has little or no role in the pathogenesis of those fibrotic diseases. Different mechanisms may lead to a common endpoint in these disorders.

This work was supported by the Scleroderma Society of Great Britain, the Arthritis and Rheumatism Council and the British Council, Programa Universitario de Investigación en Salud and Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Le Roy EC. Systemic sclerosis (scleroderma). In: Wyngaarden JB, Smith LH, eds. *Textbook of medicine*. Philadelphia: WB Saunders, 1988: 1211-30.
- Harrison NK, Gamble A, Myers A, et al. Insulin-like growth factor-1 is partially responsible for fibroblast proliferation induced by fibroblast growth factor from patients with systemic sclerosis. *Glia* 1994; 8: 141-8.
- Harrison NK, Laurent GJ. Mechanisms for the pathogenesis of pulmonary fibrosis. In: Barnes PJ, ed. *Respiratory medicine: recent*

Rapid Communication

Early-passage Rat Lung Fibroblasts Do Not Migrate *In Vitro* to Transforming Growth Factor- β

Alvaro R. Osornio-Vargas, Valerie G. Kalter, Annette Badgett, Norma Hernández-Rodríguez, Irma Aguilar-Delfino, and Arnold R. Brody

Laboratory of Pulmonary Pathobiology, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, and División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico

Lung fibrosis has been postulated to be mediated by the production of macrophage-derived growth factors as both mitogenic and chemotactic for fibroblasts. *In vitro* studies from our laboratory demonstrated that alveolar and interstitial macrophages treated with iron and asbestos release platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor- β (TGF- β) into the media. This conditioned media was capable of inducing proliferation and chemotaxis of primary rat lung fibroblasts (RLF). TGF- β is known to be present in the media, and RLF have high-affinity receptors for TGF- β . However, we found that > 95% of the chemotaxis was blocked by a polyclonal anti-PDGF antibody, whereas anti-TGF- β did not change cell migration. TGF- β has been described previously as a potent chemoattractant for fibroblasts. Thus, we tested the potential of purified TGF- β to induce RLF chemotaxis in an attempt to address this apparent contradiction in results. Four separate preparations of RLFs from four different rats, Swiss 3T3 cells, human and rat fetal skin fibroblasts, and human foreskin fibroblasts were tested for chemotaxis using purified porcine TGF- β , as well as human TGF- β . None of these cells responded chemotactically to TGF- β over a broad range of concentrations used (0.004 pg/ml to 50 ng/ml). RLF plated at different densities also did not respond to TGF- β . On the other hand, all the fibroblast types migrated vigorously to PDGF (4 ng/ml). In addition, all of the TGF- β samples induced rat mononuclear leukocyte chemotaxis (0.5 pg/ml optimal) and clearly inhibited ^3H -thymidine incorporation by the RLF as expected (0.005 ng/ml caused 50% inhibition and 0.1 ng/ml maximal inhibition). Although no clear explanation can be offered for the apparent contradiction with current dogma, variables such as cell type, source of TGF- β , and specific experimental conditions could be contributors to the TGF- β -induced chemotaxis observed by others. Thus, RLF have high-affinity TGF- β receptors, yet they lack a chemotactic response to this factor, suggesting that specific intracellular signaling mechanisms regulating biologic activities must be understood before the role of growth factors as chemotactic agents can be clarified.

Alveolar macrophages are the first cells to respond to inhaled particles deposited in the lung. This leads to the postulate that they play a central role in the inflammatory process leading to fibrosis (1, 2). Macrophage secretory products

such as platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor- β (TGF- β) have been proposed as the major mediators of cell attraction, proliferation, and extracellular matrix deposition in the lung (1, 3). We have previously demonstrated that alveolar macrophages stimulated *in vitro* with inorganic particles secrete biologically active PDGF (4-6) and TGF- β (7). The culture medium containing these two factors stimulated significant concentration-dependent rat lung fibroblast (RLF) chemotaxis that was inhibited > 95% by anti-PDGF (6). Interestingly enough, none of the chemotaxis was reduced to any measurable degree by a polyclonal antibody known to be effective as a blocking agent of TGF- β biologic activity. We found this preliminary result difficult to understand and upon review of the literature found that the direct evidence for TGF- β -induced

(Received in original form February 1, 1993 and in revised form March 4, 1993)

Address correspondence to: Arnold R. Brody, Ph.D., Department of Pathology, Tulane University Medical Center, 1430 Tulane Ave., New Orleans, LA 70112.

Abbreviations: bovine serum albumin, BSA; Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; fetal bovine serum, FBS; formylmethionyl-leucylphenylalanine methyl ester, FMLP; high-power field, hpf; phosphate-buffered saline, PBS; platelet-derived growth factor, PDGF; rat lung fibroblasts, RLF; transforming growth factor- β , TGF- β .

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., Vol. 8, pp. 468-471, 1993

FALLA DE ORIGEN

chemotaxis of fibroblasts is sparse. In order to understand this apparent contradiction, we tested the chemotactic potential of four different batches of acidified porcine TGF- β and one of pure human TGF- β on four different preparations of primary RLF, as well as on 3T3 cells, on fetal skin fibroblasts from rats and humans, and on human foreskin fibroblasts. A concentration range previously reported to be chemotactic for fibroblasts (8–11), neutrophils (12), and monocytes (13, 14) was used. We found that all the TGF- β preparations tested were biologically active in that they effected clear suppression of fibroblast growth and monocyte chemotaxis as expected. In contrast, none of the fibroblast preparations exhibited chemotaxis to the various lots of TGF- β at any concentration tested.

Materials and Methods

Cells for Chemotaxis

Primary RLF were obtained by enzymatic dissociation from the lungs of male CD rats (Charles River Laboratories, Raleigh, NC), as previously reported (4). Cells from four different preparations were always used in these experiments at passage 3 or 4.

Swiss 3T3 cells (pass 122 to 124), fetal skin rat fibroblasts (FR, pass 15 to 18), and human fetal skin fibroblasts (27 Sk, pass 7 to 9) were obtained from the ATCC (Rockville, MD). In addition, human foreskin dermal fibroblasts (pass 3) were obtained by explant (15) from a newborn, and were tested for chemotaxis as previously described (8).

Rat mononuclear leukocytes were obtained by density gradient centrifugation from heparinized venous blood, diluted (1:1) with phosphate-buffered saline (PBS) and layered on Ficoll-Paque (13). Mononuclear leukocytes were washed twice in PBS and resuspended in chemotaxis buffer (see below).

Chemotaxis

For fibroblast chemotaxis, cells were plated at 28×10^4 cells/cm² and cultured for 72 h (medium was not changed during this period), trypsinized with 0.5% trypsin (GIBCO, Grand Island, NY) in PBS-1 mM EDTA, and counted. The trypsin was promptly inactivated by dilution in a 20% solution of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) (RIA grade; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and this "chemotaxis buffer" was adjusted to pH 7.4 and monitored for stability before each chemotaxis experiment. Cells were washed two times in the chemotaxis buffer and resuspended at a final concentration of 3.5×10^6 cells/ml. Chemotaxis experiments were performed using 48-microwell chemotaxis chambers (Neuro-Probe, Cabin John, MD) (6). Polycarbonate polyvinylpyrrolidone-free membranes with a mean pore diameter of 8 μ m (Poretics Co., Livermore, CA), previously coated with 0.07% gelatin (Type A, 275 Bloom; Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) were used as previously described (16). Cells were allowed to migrate for 4 h. Porcine TGF- β (> 97% purity; R&D Systems, Minneapolis, MN) and pure human TGF- β (Collaborative Biotech, Bedford, MA) were used for RLF chemotaxis in a concentration range from 50 ng/ml (2 nM) to 0.004 μ g/ml (0.16 fM). In order to evaluate the possible role of cell density in the chemotactic response to TGF- β , RLF were plated at three different concentrations

(28,000, 14,000, and 7,000 RLF/cm²), harvested after 72 h and tested as previously described using a TGF- β concentration between 32 and 0.004 μ g/ml. The other three cell lines were tested at concentrations ranging between 8 ng/ml (320 pM) and 0.97 μ g/ml (38.8 fM). Mononuclear leukocytes were used at concentration of 1.5×10^6 in RPMI (GIBCO), 10 mM HEPES (Sigma), 1% BSA (RIA grade; Sigma) maintained at pH 7.4 and incubated for 1 h. Five-micron mean pore diameter membranes were used. One mg/ml TGF- β stock solutions were made accordingly to company recommendations in 4 mM HCl-1 mM glycine, pH 7.5 (Gibco V, Sigma). Further dilutions were made with chemotaxis buffer. Human PDGF (> 96% purity; R&D Systems) was used as a positive control for fibroblast chemotaxis at 4 ng/ml. Ten percent zymosan-activated serum or 10 nM formylmethionyl-leucylphenylalanine methyl ester (FMLP) was used as a positive control for mononuclear leukocytes. Chemotaxis buffer alone was used as a negative control. At least five experiments were done with each cell type, and each experiment was performed in triplicate. At the end of the incubation period, the cells on the membranes were fixed in methanol and stained with Diff-Quik® (American Scientific Products, McGraw Park, IL), mounted on glass slides, and the cells at the top of the membrane removed with a wet swab. The number of migrating cells was estimated by counting the cells that migrated to the bottom of the filter in 10 predetermined high-power fields (100 \times (hpf) and expressed as mean \pm SD after subtracting the number of cells that migrated toward chemotaxis buffer alone.

TGF- β , Effect on ³H-Thymidine Incorporation by RLF

RLF were thawed, grown to near confluence in DMEM + 10% fetal bovine serum (FBS) and trypsinized and plated at a density of 10,000 cells/well in Costar 12-well plastic dishes. After 24 h of growth in this medium, the cultures were washed twice with PBS (Ca²⁺- and Mg²⁺-free), and then grown for 48 h in DMEM with 1% FBS to quiesce the cells. Fresh DMEM + 1% FBS was then added in the presence of 0.1 μ Ci/ml of [³H]-methylthymidine (Amersham, Arlington Heights, IL) (R&D Systems) for 24 h at 37°C. During the last 4 h of incubation, [³H]-methylthymidine (Amersham batch #307, specific activity = 5 Ci/mM) was added at a final concentration of 1 μ Ci/well. Unincorporated thymidine was removed by two washes with ice-cold PBS, and DNA was precipitated by three rinses with ice-cold 10% trichloroacetic acid. The precipitated material was solubilized by incubation with 0.3 M NaOH + 1% sodium dodecyl sulfate for 45 min at room temperature with agitation. The solubilized material was transferred to mini vials, 4.5 ml of Ecolume (ICN Biomedicals, Irvine, CA) was added as scintillant, and the amount of radioactivity in the samples was determined in a Beckman scintillation counter (Beckman LS1800). The results were expressed in terms of percent control, with the amount of ³H-thymidine incorporation in the absence of TGF- β considered as 100%. Control RLF cultures incorporated 12,945 \pm 523 cpm.

Results

RLF Chemotaxis to TGF- β

None of the four different batches of porcine TGF- β or the purified human TGF- β tested at different concentrations

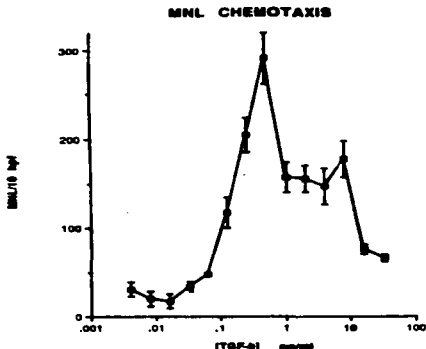


Figure 1. Rat mononuclear leukocytes (MNL) exposed to different concentrations of pure TGF- β exhibited a typical bell-shaped dose-response chemotaxis curve. Optimal activity was achieved with 0.5 pg/ml.

resulted in migration of RLF above the negative control (chemotaxis buffer alone) values (3 ± 2 RLF/10 hpf). On the other hand, PDGF used as a positive control always induced migration of these fibroblasts (112 ± 16 RLF/10 hpf). Cell density did not play any role since none of the three densities tested resulted in chemotaxis. The other cells tested (Swiss 3T3, FR, 27 Sk, and human foreskin fibroblasts) also gave negative results for TGF- β , whereas their migration to 4 ng/ml PDGF was 130 ± 17 , 23 ± 2.8 , 35 ± 8.1 , and 31 ± 5 , respectively. Checkerboard analysis demonstrated that the migration induced by PDGF was clearly concentration dependent, as previously reported (6). Rat mononuclear leukocytes responded chemotactically to several logs of TGF- β , and 0.5 pg/ml (20 fM) was the concentration at which optimal activity (204 ± 19 cells/10 hpf) was achieved (Figure 1). Ten percent zymosan-activated serum or 10 nM FMLP induced similar responses (270 ± 20 cells/10 hpf).

TGF- β , Effect on 3 H-Thymidine Incorporation by RLF
Increasing concentrations of porcine TGF- β inhibited the incorporation of 3 H-methylthymidine by RLF cultures in a dose-dependent manner (Figure 2). The concentration at which 50% inhibition was obtained was 0.005 ng/ml (0.2 pM). Maximal inhibition was observed at a TGF- β concentration of 0.1 ng/ml (4 pM).

Discussion

The results presented here demonstrate that in our hands TGF- β does not induce the migration of early-passage RLF within a concentration range previously reported as chemo-

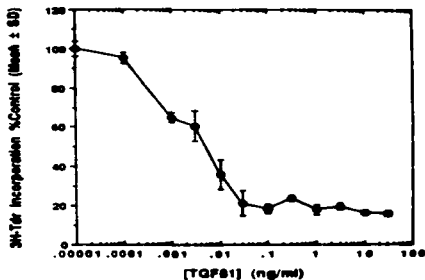


Figure 2. Increasing inhibition of 3 H-thymidine (3H-Tdr) incorporation by RLF was TGF- β concentration dependent. Half inhibition was observed at 0.2 pM (0.005 ng/ml), and total inhibition was achieved at 4 pM (0.1 ng/ml).

tactic for human fibroblasts (8), bovine fibroblasts (9, 10), human neutrophils (12), and human monocytes (13, 14). We also found that other fibroblastic cells from mice, rats, and humans (including foreskin fibroblasts) did not migrate towards the TGF- β used. This is in apparent contrast to previous reports describing TGF- β -induced chemotaxis of human foreskin fibroblasts (8) at an optimal concentration of 12.5 pg/ml, bovine ligament fibroblasts at ~ 0.5 pg/ml (9, 10), and embryonic chick limb bud mesenchymal cells and muscle-derived fibroblasts at optimal concentrations of 0.5 ng/ml and 0.25 ng/ml, respectively (11).

Our results were obtained with two different sources and types of TGF- β , including four different lots from the same source. Caution in diluting and activating lyophilized TGF- β was taken. In addition, we found that the same TGF- β that was unable to cause fibroblast chemotaxis was clearly capable of inducing, within the same concentration range tested, mononuclear leukocyte chemotaxis and inhibition of 3 H-thymidine incorporation by RLF. There is additional evidence suggesting that not all types of fibroblasts are chemotactically responsive to TGF- β . Foreskin fibroblasts did not respond chemotactically to commercially available purified human TGF- β (17), and 3T3 cells gave inconsistent results in comparison to CH23 fibroblasts when tested for chemotaxis to a TGF- β -related peptide from bovine serum (18). In addition, contradictory results have been published using foreskin dermal fibroblasts (8, 17), and Kondo and associates (19) found that a fibroblast line from human skin was not stimulated to migrate by TGF- β purified from human platelets. Differences in chemotaxis could be related to cell type, source of TGF- β , the time the cells have been maintained in culture, cell density, and perhaps additional variables. This concept has been suggested to explain lack of PDGF-induced monocyte chemotaxis (20). Small amounts of substances capable of inducing chemotaxis could be present in TGF- β purified from serum. However, recombinant

TGF- β has proven to be chemotactic for bovine ligament fibroblasts (9), suggesting that contamination is unlikely to play a role in all cases. Other methodologic variables could be postulated as responsible for differences in TGF- β -induced fibroblast chemotaxis, e.g., the type and concentration of albumin used in the chemotaxis buffer (9, 10), the presence of serum in the chemotaxis media (11, 18), and the practice of pre-adherence of cells to the polycarbonate membrane in the presence of serum hours before the chemotaxis experiment was performed (11). Our negative results, and those obtained by others, are consistent with low concentrations of highly purified (see MATERIALS AND METHODS) or no BSA (17) were used in the chemotaxis buffer. In our hands, high BSA concentrations caused an increased background of fibroblast migration (unpublished observations), as noted by others (9). It is possible that trace contaminants of chemoattractants present in the BSA could be playing a role in TGF- β -induced chemotaxis. In addition, cell density is known to affect fibroblast chemotaxis (6). Experiments performed here were done with cells obtained from confluent cultures at a density previously reported as optimal for PDGF-induced RLF chemotaxis (6). However, none of the three different densities tested resulted in RLF chemotaxis by TGF- β . All of the variables cited above make it difficult to directly compare results from different laboratories and leave open the possibility that experimental conditions may be playing an important role in whether or not there will be induction of fibroblast chemotaxis by TGF- β .

TGF- β also is capable of inducing apparently opposing effects on fibroblast proliferation. Recent evidence suggests that such effects are dose related and are due to an indirect response modulated by a second molecule—PDGF—and its receptors (21, 22). A similar situation could be linked to TGF- β -induced fibroblast chemotaxis, and further studies are ongoing to test this postulate.

Finally, RLF possess high-affinity TGF- β receptors that are very sensitive to exogenous TGF- β (23). We have previously demonstrated that TGF- β inhibits RLF proliferation with an ED₅₀ of 0.003 ng/ml (0.12 pM) (23). The present results indicate that TGF- β also inhibits RLF DNA synthesis at a similar concentration (0.2 pM) (Figure 2). New experiments from our laboratory also show that samples of the TGF- β used here upregulate the genes for fibronectin and collagen in these cells (Dr. Audrey Goodell, unpublished observations and reference 24). These biologic studies indicate that the RLF receptors for TGF- β are extremely sensitive to both TGF- β_1 and TGF- β_2 (23). The lack of a chemotactic response in a variety of fibroblast-like cell types may indicate that the TGF- β receptors are not providing the signaling mechanisms necessary for chemotaxis. Thus, it appears as though not all fibroblast cells migrate to all lots of TGF- β , and investigators should exercise appropriate caution in interpreting chemotaxis studies. We are continuing our search for a TGF- β that will act as a positive chemoattractant for early-passage RLF and are asking whether or not this system will be advantageous in studying the mechanisms of growth factor-induced chemotaxis.

Address correspondence to We thank Beatriz Blanco, B.S., from the Department of Genetics, Instituto Nacional de Pediatría, for providing the human fibroblast cell lines and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) for partial support [A1282CODE-920821SA-71].

References

1. Brody, A. R. 1991. Production of cytokines by particle-exposed lung macrophages. In *Cellular and Molecular Aspects of Fiber Carcinogenesis*, C. J. Lehner, and W. Brady, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1-102.
2. Nathan, C. F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79:119-128.
3. Roberts, A. B., and M. B. Sporn. 1989. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF- β . *Am. Rev. Respir. Dis.* 140:1126-1128.
4. Kumar, R. K., R. A. Bennett, and A. R. Brody. 1988. A homologue of platelet-derived growth factor produced by alveolar macrophages. *FASEB J.* 2:272-277.
5. Bauman, M. D., A. M. Jetten, J. C. Bunner, R. K. Kumar, R. A. Bennett, and A. R. Brody. 1990. Secreted and stored growth factor homologue in rat alveolar macrophages exposed to particulates *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 51:327-334.
6. Osorio-Vargas, A. R., J. C. Bunner, A. Baggett, and A. R. Brody. 1990. Rat alveolar macrophage-derived platelet-derived growth factor is chemotactic for rat lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:995-1002.
7. Kallier, V. G., and A. R. Brody. 1989. Secretion of TGF- β by rat alveolar macrophages: dual characterization of receptors for TGF- β on rat lung fibroblasts. *Cytotrust* 1:76 (Abstr.).
8. Postlethwaite, A. E., J. Keski-Oja, H. L. Moses, and A. H. Kang. 1987. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J. Exp. Med.* 165:251-256.
9. Senior, R. M., G. L. Griffin, H. D. Perez, and R. O. Webster. 1988. Human C3a and C3a des arg exhibit chemotactic activity for fibroblasts. *J. Immunol.* 141:3570-3574.
10. Pierce, G. F., T. A. Mause, J. Lingbeihl, V. R. Masakowski, G. L. Griffin, R. M. Senior, and T. F. Deuel. 1989. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J. Cell Biol.* 109:439-440.
11. Lucas, P. A., and A. I. Caplan. 1988. Chemotactic response of embryonic limb bud mesenchymal cells and muscle-derived fibroblasts to transforming growth factor- β . *Connect. Tissue Res.* 17:17.
12. Reichman, J., S. Meisler, T. C. Lee, L. J. Gold, B. N. Cronstein, K. A. Haines, S. L. Kolesnick, and G. Weissmann. 1991. Transforming growth factor- β : a potent chemoattractant for human neutrophils, impairs classic signal-transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6805-6809.
13. Wahl, S. M., D. A. Hunt, L. M. Wakelin, N. McCartney-Francis, L. M. Wahl, and M. B. Sporn. 1987. Transforming growth factor type II induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3788-3792.
14. Wiseman, D. M., J. Polverini, D. W. Kamp, and S. J. Leebich, 1988. Transforming growth factor-beta (TGF- β) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:770-774.
15. Sly, W., and J. Grubb. 1979. Isolation of fibroblasts from patients. *Methods Enzymol.* 58:448-450.
16. Postlethwaite, A. E., R. S. Nardman, and A. H. Kang. 1976. The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor. *J. Exp. Med.* 144:1118-1123.
17. Adelman-Gruil, B. C., F. Wach, Z. Cully, R. Hein, and T. Krieg. 1990. Hemostatic regulation of neovascularization: TGF- β is a novel epidermal growth factor and its modulation by platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Eur. J. Cell Biol.* 51:322-326.
18. Edwards, S. J., and A. V. Srinivasan. 1990. Morphologic transformation of chemotactic migration of fibroblasts by TGF- β -related 25kD polypeptide. *Int. J. Cancer* 46:979-984.
19. Kondo, H., R. Masuda, and Y. Yonezawa. 1992. Platelet-derived growth factor in combination with collagen promotes the migration of human skin fibroblasts into a denuded and an occlusive monolayer. *Exp. Cell Res.* 202:45-51.
20. Graves, D. T., G. B. Grossmors, H. N. Antonides, C. S. Schwartz, and J. M. Mizel. 1989. Platelet-derived growth factor is not chemotactic for human peripheral blood monocytes. *Exp. Cell Res.* 190:497-503.
21. Baggett, A., A. R. Brody, and A. P. Weissman. 1990. TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via a complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 63:315-324.
22. Moon, H. B., and A. P. Weissman. 1990. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 61:247-249.
23. Kallier, V. G., and A. R. Brody. 1991. Receptors for transforming growth factor β (TGF- β) on rat lung fibroblasts have higher affinity for TGF- β_1 than for TGF- β_2 . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13:97-102.
24. Goodell, A. I., J. C. Bunner, and A. R. Brody. 1992. Transforming growth factor beta but not platelet derived growth factor (PDGF) and adherens-1 are chemotactic for human lung fibroblasts. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:441 (Abstr.).

Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-AA, -AB, and -BB Induce Differential Chemotaxis of Early-Passage Rat Lung Fibroblasts *In Vitro*

Alvaro R. Osornio-Vargas, Audrey L. Goodell,¹ Norma A. Hernández-Rodríguez, Arnold R. Brody,² Patrick G. Coin, Annette Badgett, and James C. Bonner

Laboratory of Pulmonary Pathobiology, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, and Division of Clinical Investigation, National Cancer Institute, Tlalpan, Mexico

Platelet-derived growth factor (PDGF) isoforms are chemoattractants and mitogens for cells of mesenchymal origin that constitute the predominant mediators of pulmonary fibrogenesis. We have previously reported that particle-activated alveolar macrophages secrete homologues of PDGF that are composed of all three PDGF isoforms (PDGF-AA, -AB, and -BB). This mixture of macrophage-derived PDGF, once dissociated from the PDGF- α -macroglobulin complex, induces chemotaxis of rat lung fibroblasts (RLF) in the nanomolar range. In addition, we have reported that PDGF isoforms induce differential proliferation of RLF (PDGF-BB > PDGF-AA > PDGF-AA). In the present study, we sought to determine the relative chemotactic potency of the three PDGF isoforms and correlate these responses to the relative abundance of the two types of PDGF cell-surface receptors: PDGF- α receptor (PDGF-R α) and PDGF- β receptor (PDGF-R β). We also investigated the chemotactic activity of combinations of two PDGF isoforms simultaneously. Isolates of early-passage RLF were assayed for chemotaxis in 48-microwell chambers. Swiss mouse 3T3 cells were assayed in parallel as a positive control cell line for PDGF-R α and PDGF-R β expression. RLF responded differentially to the PDGF isoforms: PDGF-AB and PDGF-BB were potent chemoattractants and stimulated maximal chemotactic responses between 4 and 8 ng/ml PDGF, whereas PDGF-AA elicited a weak chemotactic response that was maximally 15% of that obtained with either B-chain isoform. PDGF-AB and PDGF-BB were also the most potent chemoattractants for Swiss 3T3 cells, and their response to these B-chain isoforms was \sim 40% greater than that obtained for RLF. Swiss 3T3 cells showed a 3-fold greater response to PDGF-AA when compared with RLF. Northern analysis demonstrated that RLF strongly expressed a 5.2 kb PDGF-R β transcript and only a weak expression for a 6.5 kb PDGF-R α transcript. In contrast, Swiss 3T3 cells strongly expressed both PDGF-R β and PDGF-R α . Radioligand binding assays for [¹²⁵I]PDGF-BB showed that RLF possessed mainly PDGF-R β at the cell surface ($B_{max} = \sim$ 70 fmol/10⁶ cells; $K_d = 0.1$ nM), and preincubation with 50 ng/ml PDGF-AA prior to binding decreased receptor number < 10%, indicating a low level of cell-surface PDGF-R α . Swiss 3T3 cells also bound [¹²⁵I]PDGF-BB with a K_d of 0.1 nM, but possessed a B_{max} of \sim 175 fmol/10⁶ cells, and preincubation with 50 ng/ml PDGF-AA reduced the B_{max} to \sim 80 fmol/10⁶ cells while increasing receptor affinity 3-fold. Further analysis of the radioligand binding data showed that Swiss 3T3 cells possessed approximately equal numbers of cell-surface PDGF-R α and PDGF-R β subunits. Finally, we observed that combinations of two different PDGF isoforms mixed at equal concentrations produced additive chemotactic effects. These data indicate that all three PDGF isoforms are chemoattractants for fibroblasts, and the chemotactic response to PDGF-AA, as well as PDGF-AB and PDGF-BB, depends on the abundance of cell-surface PDGF-R β relative to PDGF-R α .

(Received in original form May 6, 1994 and in revised form July 27, 1994)
Address correspondence to James C. Bonner, Ph.D., Laboratory of Pulmonary Pathobiology, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC 27709.

Abbreviations: bovine serum albumin, BSA; Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; fetal bovine serum, FBS; high-power light microscopic histology, HPL; platelet-derived growth factor, PDGF; platelet-derived growth factor receptor, PDGF-R; rat lung fibroblasts, RLF; serum-free defined medium, SFDM; transforming growth factor- α , TGF- α .

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Vol. 12, pp. 33-40, 1995

Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF homologues produced by macrophages are potent chemoattractants and mitogens for fibroblasts (1-4) and smooth muscle cells (5, 6) that function as mediators in development and

¹ Current address: North Carolina State University, PO Box 7613, Raleigh, NC 27695

² Current address: Tulane University Medical Center, School of Medicine, Department of Pathology and Laboratory Medicine, SL-79, 1419 Tulane Ave., New Orleans, LA 70112.

FALLA DE ORIGEN

tissue repair. The aberrant expression of lung macrophage-derived PDGF has been postulated as a mechanism that contributes to the progression several pulmonary fibrotic diseases, including idiopathic pulmonary fibrosis (7-9) and asbestosis (4, 10).

Two monomeric polypeptide chains of PDGF, termed A and B, are encoded by separate genes and these chains dimerize via sulfhydryl bridges to form bioactive PDGF-AA, -AB, and -BB isoforms (11). The dimeric isoforms bind differentially to high-affinity cell-surface PDGF- α or PDGF- β receptor subunits, resulting in receptor dimerization to form functional $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ and $\beta\beta$ receptors (11-13). The PDGF-B chain binds both α and β receptor subtypes, whereas the PDGF-A chain interacts only with the α -receptor subtype (12).

Previously, we have shown that rat alveolar macrophage-derived PDGF is chemotactic and mitogenic for primary rat lung fibroblasts (RLF) (3, 4). Rat and human lung macrophages secrete a mixture of all three PDGF isoforms that is primarily composed of the PDGF-BB homodimer (4, 14). Fibrogenic particles such as chrysotile asbestos fibers induce the secretion of PDGF isoforms by macrophages (4) and PDGF-AA by RLF (15). The majority of PDGF secreted by particle-activated rat alveolar macrophages is complexed by a homologue of α_2 -macroglobulin (α_2M) (10), and this binding protein inhibits PDGF-stimulated fibroblast chemotaxis (3). Thus, binding proteins could serve an important regulatory function for controlling PDGF-stimulated chemotaxis.

It has also been postulated that chemotaxis induced by one PDGF isoform could be modulated by another PDGF isoform. PDGF-AB and PDGF-BB have been shown to promote the chemotaxis of human dermal fibroblasts, whereas PDGF-AA inhibits chemotaxis induced by PDGF-BB (16, 17) and PDGF-AB (16). Furthermore, it has been reported that PDGF-AA alone is not a chemottractant (17). Thus, the relative ratio of PDGF-AA to PDGF-AB or PDGF-BB secreted by a certain cell type and the relative abundance of PDGF-R α and PDGF-R β on the responding cell determine the overall chemotactic response of fibroblasts.

The chemotactic activity of each of the three PDGF isoforms for pulmonary fibroblasts has not been investigated, nor have possible modulatory effects of mixtures of the PDGF isoforms been addressed. In the present study, we describe the differential chemotactic responses of RLF and Swiss 3T3 cells to the different PDGF isoforms. We have also explored the possibility that one PDGF isoform might influence the chemotactic potency of another isoform. We report that all isoforms are chemotactic for fibroblasts, yet the relative activity of PDGF-AA depends on the abundance of the PDGF-R α . We suggest that a complex interaction of the different PDGF isoforms and their receptors could allow for fine tuning of the chemotactic response during tissue repair processes and that an imbalance in this system could contribute to pulmonary fibrogenesis.

Materials and Methods

Fibroblasts

The procedure and characterization of primary RLF obtained by enzymatic dissociation from the lungs of male CD

rats (Charles River Laboratories, Raleigh, NC) has been described in detail elsewhere (18). Swiss 3T3 cells were obtained from ATCC (Rockville, MD).

Chemotaxis

For chemotaxis, second-passage RLF or Swiss 3T3 cells were plated at 28×10^4 cells/cm² and cultured for 72 h, trypsinized with 0.5% trypsin (GIBCO, Grand Island, NY) in phosphate-buffered saline-1 mM EDTA and counted using a hemocytometer. The trypsin was promptly inactivated by dilution into chemotaxis buffer (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] containing 0.5% bovine serum albumin [BSA] [RIA grade, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO]). Cells were washed 2 times in chemotaxis buffer and resuspended in a final concentration of 3.5×10^6 cells/ml. Chemotaxis experiments were performed using 48-microwell chemotaxis chambers (Neuro-Probe, Cabin John, MD) (19). Polycarbonate polyvinylpyrrolidone-free membranes with a mean pore diameter of 8 μ m (Poretics Co., Livermore, CA), previously coated with 0.07% gelatin (Type A, 275 Bloom; Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) were used (20). Cells were allowed to migrate for 4 h at 37°C in 5% CO₂-humidified air. Recombinant PDGF-AA (American Scientific Products, Bedford, MA), PDGF-AB (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) and PDGF-BB (Collaborative Research) and human PDGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) were tested for chemotaxis at different concentrations (0.125 to 64 ng/ml). Checkerboard analysis was performed for each PDGF isoform as previously described (21). In addition, mixtures of different PDGF isoforms were also tested for chemotaxis, mixing 1, 2, and 4 ng/ml PDGF-AA with equimolar concentrations of either PDGF-AB or PDGF-BB. At least five experiments were done with each cell type, and each experiment was performed in triplicate. At the end of the incubation period, the cells on the membranes were fixed in methanol and stained with DiI-Quin (American Scientific Products, Bedford, IL) and mounted on glass slides, and the cells on top of the membranes were removed with a wet swab. The number of migrating cells was determined by counting the cells that migrated to the bottom of the filter in 10 predetermined (10 \times) high-power fields (HPF) and expressed as mean \pm SD after subtracting the number of cells that migrated toward chemotaxis buffer alone (1 to 3 cells/10 HPF). In some experiments, an alternative computerized method for evaluating cell migration was used: Glass slides with stained chemotaxis membranes were digitized with a flatbed scanner (Microtek, Torrance, CA), and further analysis was performed with an image analysis program (NIH-Image; National Institutes of Health, Bethesda, MD). The average optical density of the stained cells from each well was determined from the digitized image. The density of an adjacent cell-free region of the chemotaxis membrane was subtracted to yield the relative density value for each well. Relative density measurements correlated well with microscopic counts ($r^2 = 0.85$; see Figure 7).

Northern Analysis for PDGF-R α and PDGF-R β mRNA

Rat lung fibroblasts or 3T3 cells were grown to confluence in 150-cm² flasks in 10% fetal bovine serum (FBS) DMEM and then rendered quiescent for 24 h in serum-free medium

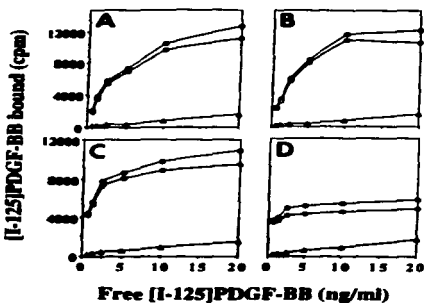
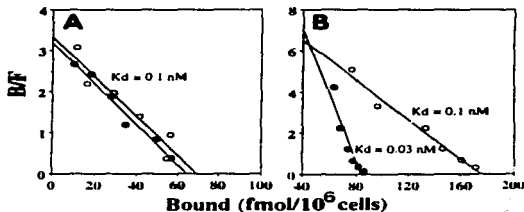


Figure 4. Saturation binding of [¹²⁵I]PDGF-BB to confluent cultures of RLF and Swiss 3T3 cells treated with SFDM or SFDM supplemented with 50 ng/ml PDGF-AA for 2 h at 37°C to internalize and deplete PDGF-Rα at the cell surface. Closed circles represent total binding, closed triangles represent nonspecific binding in the presence of 500 ng/ml PDGF-BB, and open circles represent specific binding. A, RLF. B, RLF pretreated with PDGF-AA. C, Swiss 3T3 cells. D, Swiss 3T3 cells pretreated with PDGF-AA. Pretreatment with PDGF-AA did not appreciably affect the binding of [¹²⁵I]PDGF-BB to RLF but reduced binding to Swiss 3T3 cells by approximately half.

tion data demonstrated that RLF possess a maximal number of [¹²⁵I]PDGF-BB binding sites (B_{max}) of ~ 70 fmol/ 10^6 cells with a dissociation constant (K_d) of 0.1 nM (Figure 5A). PDGF-AA preincubation reduced the number of [¹²⁵I]PDGF-BB binding sites on Swiss 3T3 cells from 175 cells to 80 fmol/ 10^6 cells and increased binding affinity 3-fold ($K_d = 0.1$ nM to $K_d = 0.03$ nM) (Figure 5B). We calculated the numbers of PDGF-Rα and PDGF-Rβ subunits per million cells (Figure 6), based on the method de-

Figure 5. Scatchard analysis of the binding data presented in Figure 4. Closed circles represent pretreatment with PDGF-AA and open circles represent pretreatment with medium alone. A, Pretreatment of RLF with PDGF-AA caused only a slight reduction in maximal number of binding sites (69 to 53 fmol/ 10^6 cells). B, [¹²⁵I]PDGF-BB binding to 3T3 cells was markedly altered (increased affinity and decreased number of binding sites) by PDGF-AA pretreatment. Quantitation of the relative numbers of PDGF-Rα and PDGF-Rβ for RLF and Swiss 3T3 cells are shown in Figure 6.



scribed by Seifert and colleagues (12), which assumes that [¹²⁵I]PDGF-BB binds both PDGF-Rα and PDGF-Rβ subunits, whereas PDGF-AA binds only PDGF-Rα. Thus, cells preincubated with excess PDGF-AA have only PDGF-Rβ subunits for [¹²⁵I]PDGF-BB binding. The difference between these two measurements (i.e., cells treated with or without 50 ng/ml PDGF-AA) yields the number of PDGF-Rα, allowing that PDGF receptor subunit model predicts the PDGF-BB isoform binds dimeric αα, αβ, or ββ receptors. We found that RLF possessed mainly PDGF-Rβ, whereas Swiss 3T3 cells had approximately equal numbers of both receptor subunits (Figure 6). However, Swiss 3T3 cells were observed to spontaneously down-regulate their PDGF-Rα after several days in SFDM (data not shown).

Chemotaxis to Mixtures of Different PDGF Isoforms Are Additive

Chemotaxis to mixtures of PDGF dimers was tested at concentrations below maximal activity to avoid the inhibitory effects that are normally seen at higher concentrations, where the descending arm of a typical bell-shaped chemotaxis curve is reached (Figures 1 and 2). In these chemotaxis experiments, we employed a rapid computer-assisted imaging technique for quantitation of cells on the chemotaxis filters (see MATERIALS AND METHODS). A reliable correlation ($r^2 = 0.85$) was obtained for the relationship between cells/ 10^6 HPF and relative optical density in chemotaxis experiments performed with increasing concentration of PDGF-BB (Figure 7). Mixtures of different recombinant PDGF isoforms were tested on RLF two at a time for chemotactic potency relative to the individual isoforms alone (Figure 8). In all cases, mixtures of the different PDGF isoforms induced an additive chemotactic response for RLF.

Discussion

The fibrotic process in the lung is characterized by mesenchymal cell accumulation, proliferation, and their production of extracellular matrix. Several studies have reported that alveolar and interstitial lung macrophages are an important source of PDGF-B chain isoforms and these molecules may play a role in fibroblast recruitment and replication (4, 26, 27). PDGF-B chain gene expression by human alveolar macrophages is increased in idiopathic pulmonary fibrosis

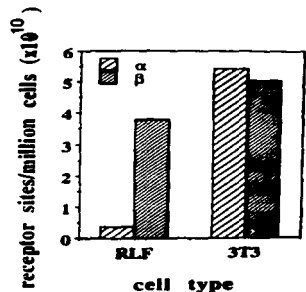


Figure 6. Quantification of the relative numbers of PDGF-R α and PDGF-R β subtypes on RLF and Swiss 3T3 cells derived from four separate experiments, one of which is shown in Figure 5. RLF possess barely detectable levels of PDGF-R α and have an abundance of PDGF-R β . Swiss 3T3 cells have approximately equal numbers of PDGF-R α and PDGF-R β . Numbers of receptor subunits were calculated based on the model that predicts PDGF-BB binds α and β receptor subtypes, whereas PDGF-AA binds only α receptor subtypes (see RESULTS).

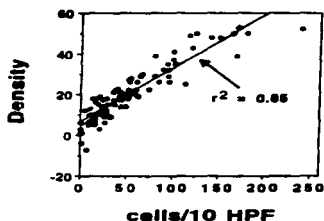


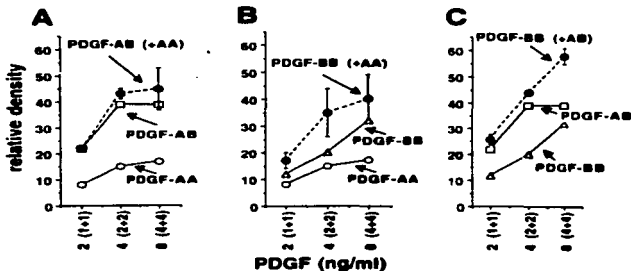
Figure 7. Correlation of chemotaxis by direct counts of stained migrating cells in 10 predetermined HPF to computer-assisted optical density measurements of the total chemotaxis membrane area where stained cells from the same experiments were present. The comparison of direct counts to relative optical density was determined over a concentration range of PDGF-BB (0.25 to 32 ng/ml). Linear regression showed a good correlation between these two methods ($r^2 = 0.88$, $n = 48$), indicating that results obtained with either method are valid. Optical density measurements allowed for a more rapid assessment of fibroblast chemotaxis.

(26). Another investigation reported that PDGF-B chain expression *in situ* is localized primarily in interstitial macrophages (27). In a rat model of asbestos-induced pulmonary fibrosis (28), we previously reported that both alveolar and interstitial lung macrophages are sources of PDGF-B chain homologues (4, 10). Thus, PDGF may play a role both in normal lung tissue remodeling and in the pathogenesis of fibrosis.

We observed a differential chemotactic response of rat lung fibroblasts to PDGF-AA, -AB, and -BB that was similar to the differential mitogenic response that we previously reported (4). Differential chemotactic responses of nonpulmonary fibroblast cell lines have been described previously by other investigators (16, 29-32). Indeed, studies have been performed with naive hematopoietic cells (33) or naive endothelial cells (34) transfected with the genes for either PDGF-R α or PDGF-R β that demonstrated both α - and β -independently induce chemotactic or mitogenic responses to PDGF. However, this is the first report describing the differential chemotactic responses of early-passage lung fibroblasts to the different PDGF isoforms. These lung fibroblasts possessed staining characteristics (i.e., positive staining for vimentin, actin, and fibronectin) of the fibroblast/myofibroblast phenotype that is present *in vivo* at sites of fibrosis in rats that have inhaled asbestos (15, 28). Thus, we have studied the chemotactic responses of fibroblasts *in vitro* that phenotypically resemble the fibroblast/myofibroblast population *in vivo*. Both PDGF-AB and -BB were potent chemoattractants and mitogens for these lung fibroblasts, whereas PDGF-AA was an extremely weak mitogen and chemoattractant. These findings agree with other studies performed on nonpulmonary smooth muscle cells and fibroblasts that possess differential mitogenic and chemotactic responses to the three PDGF isoforms in an identical pattern (i.e., BB > AB > AA) (16, 29-32). The lack of RLF responsiveness to PDGF-AA is related to reduced gene expression of the PDGF-R α , to which PDGF-AA binds. PDGF-AB and -BB bind to this receptor as well, but they also bind to the PDGF-R β . Thus, RLF mediate their chemotactic response to PDGF-B chain isoforms almost exclusively via the PDGF-R β , which dimerize to form functional -BB receptors. This is consistent with our previous observation regarding chemotaxis of RLF to rat alveolar macrophage-derived PDGF homologues, in which chemotaxis was blocked by a PDGF antibody that recognized the PDGF-AB and -BB isoforms, but not PDGF-AA (3). Further investigation demonstrated that the majority of macrophage-derived PDGF was composed of B-chain-containing isoforms (4). Taken together with the present study, we conclude that activated alveolar macrophages signal RLF chemotaxis by releasing PDGF-B chain-like molecules that bind the PDGF-R β .

PDGF-AA is also a chemoattractant for cells that possess the PDGF-R α . Swiss 3T3 cells expressed PDGF-R α mRNA, possessed abundant cell-surface PDGF-R α , and were 3 times more responsive chemotactically to PDGF as compared with RLF, although the maximal response of 3T3 cells to PDGF-AA was less than half that observed for PDGF-AB or -BB-stimulated chemotaxis (Figure 1). In agreement with other investigators (12, 29), we found that 3T3 cells possessed equal numbers of PDGF-R α and PDGF-R β . The reason for the lower potency of PDGF-AA as com-

Figure 8. Chemotaxis of RLF to different PDGF isoforms. PDGF-AB mixed with PDGF-AA did not induce a chemotactic effect different from that one obtained for PDGF-AB alone (A). PDGF-BB mixed with PDGF-AA resulted in an additive effect when compared with PDGF-AA or PDGF-BB alone (B). PDGF-BB mixed with PDGF-AB also resulted in an additive effect (C).



pared with PDGF-AB or -BB for Swiss 3T3 cell chemotaxis is presently unknown.

The data presented in the present study suggest that PDGF-AA is not an important chemoattractant for RLF. However, it is necessary to consider circumstances under which PDGF-AA could become a mediator of fibroblast chemotaxis. Although RLF normally have a low gene expression for the PDGF-R α and a low number of PDGF-R α at the cell surface, we have recently reported that their gene expression and subsequent cell-surface appearance of PDGF-R α is increased following exposure to asbestos fibers *in vitro* (23). Other investigators have reported that IL-1 β , tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β (TGF- β), and fibroblast growth factor up-regulate this receptor on various connective tissue cells (35-37). TGF- β has also been reported to down-regulate the PDGF-R on connective tissue cells (38, 39). We have recently observed that interleukin-1 β treatment up-regulates PDGF-R α on RLF and markedly increases their chemotactic response to all three PDGF isoforms (40). Fibroblasts and smooth muscle cells mainly produce PDGF-AA, and its secretion is increased by TGF- β and interleukin-1 (38, 41). RLF produce PDGF-AA (42), and we have shown that asbestos-treated RLF increase their secretion of PDGF-AA (15). Thus, a variety of different endogenous stimuli (cytokines) or exogenous stimuli (inorganic particles) could trigger RLF *in vivo* to become more responsive to PDGF-AA-induced chemotaxis through PDGF-R α up-regulation. Fibroblasts and smooth muscle cells also produce PDGF-AA in response to these stimuli, and thus all of these agents have been proposed to drive mitogenesis via an autocrine PDGF-AA loop. However, if PDGF-AA and PDGF-R α are up-regulated simultaneously, then fibroblasts could inhibit their own chemotaxis by establishing a relatively high local concentration of PDGF in the interstitial microenvironment.

Other investigators have suggested that PDGF-AA is inhibitory for PDGF-BB- and PDGF-AB-induced chemotaxis (16, 17). In these studies, increasing amounts of PDGF-AA were mixed with optimal chemotactic concentrations (i.e.,

peak of the chemotactic bell-shaped curve) of PDGF-BB (10 ng/ml) or PDGF-AB (5 ng/ml). Under such circumstances, an additive effect could be mistaken for an inhibitory effect since total PDGF concentrations would be above optimal activity in the descending part of the chemotaxis curve (see Figures 1 and 2). Our results indicate that mixtures of equal concentrations of PDGF-AA and -AB, PDGF-AA and -BB, or PDGF-AB and -BB result in at least additive RLF chemotaxis (Figure 8). PDGF-AA mixed with an equal concentration of PDGF-BB appeared to enhance chemotaxis when compared with PDGF-BB alone (Figure 8B), although this trend was not supported by statistical analysis (paired Student's *t* test) of the data. The total concentration of any mixture of PDGF isoforms in these experiments did not exceed the optimal concentration for chemotaxis observed in earlier experiments (Figures 1 and 2). However, it is possible that differences in the types of fibroblasts, smooth muscle cells, and myofibroblasts could explain the differences in results obtained for RLF in our studies and the fibroblasts used in other studies (16, 17). Further studies should address the responses of these various connective tissue cells in parallel.

In summary, we have demonstrated that RLF respond chemotactically to all three PDGF isoforms (i.e., -AA, -AB, and -BB), but their response to PDGF-AA is weak because of reduced gene expression and cell-surface appearance of the PDGF-R α to which PDGF-AA binds. These cells strongly expressed the PDGF-R β gene, possessed mainly PDGF-R β cell-surface receptors, and were 7 times more responsive to PDGF-AB and PDGF-BB isoforms as compared with PDGF-AA. Pairwise combinations of the different PDGF isoforms caused additive chemotactic responses of lung fibroblasts. These data suggest that PDGF-B chain isoforms, such as those produced by lung macrophages, are important for the recruitment of lung fibroblasts and could play a key role during the progression of pulmonary fibrosis.

Acknowledgments. We thank Jenni A. Ingram for excellent technical assistance. We thank Dr. Karen Guzman and Dr. Larry Ostrowski for helpful discussions during the preparation of the manuscript. Dr. Osorio-Vargas' research was funded in part by a Fogarty International award from the State Department.

Bureau of Ocean and International Environmental and Scientific Affairs, Washington, DC and by the Office of International Programs, NIEHS. We thank Dr. Terry Demaris and Dr. Ariane Fournoff for support.

References

- Ross, R., E. W. Raines, and D. F. Bowen-Pope. 1986. The biology of platelet-derived growth factor. *Crit. Rev. Biochem. Cell Biol.* 12:159-190.
- Seppa, M., O. Grotenbosch, S. Seppa, E. Schiffman, and G. R. Martin. 1982. Platelet-derived growth factor is a chemotactic for fibroblasts. *J. Cell Biol.* 92:584-588.
- Carmio-Vargas, A. R., J. C. Bonner, A. Badgett, and A. R. Brady. 1990. Rat alveolar macrophage-derived platelet-derived growth factor is chemotactic for rat lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3:595-602.
- Bonner, J. C., A. R. Osornio-Vargas, A. Badgett, and A. R. Brady. 1991. Differential proliferation of rat lung fibroblasts induced by the platelet-derived growth factor (PDGF)-A, -B, and - β isoforms secreted by rat alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3:539-547.
- Grotenbosch, G. R., T. Chang, H. E. J. Seppa, K. M. Kleinman, and G. R. Martin. 1982. Platelet-derived growth factor is a chemotactant for vascular smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.* 113:261-266.
- Sjolund, M., U. Klein, T. Sazeran, C. Heidin, and J. Thyberg. 1988. Arterial smooth muscle cells express platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, secrete a PDGF-like monogen, and bind exogenous PDGF in a receptor- and growth state dependent manner. *J. Cell Biol.* 110:403-413.
- Norman, J., Y. Martinez, K. Yamachi, P. B. Bitterman, A. Grotenbosch, A. Chytil-Weir, G. R. Martin, and R. G. Crystal. 1986. Spontaneous expression of the α_1 -gene and release of a platelet-derived growth factor like molecule by human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 78:61-66.
- Martinez, Y., W. N. Rom, G. R. Grotenbosch, G. K. Martin, and R. G. Crystal. 1987. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *V. Engl. J. Med.* 317:202-209.
- Antonoulati, M., M. A. Bravo, B. E. Avila, T. Galanopoulos, J. Neville-Golden, M. Maxwell, and M. Seltman. 1990. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 86:1053-1066.
- Bonner, J. C., M. Hoffman, and A. R. Brady. 1989. Alpha-macroglobulin is secreted by alveolar macrophages and binds to PDGF receptors for macrophage-derived homologue of platelet-derived growth factor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1:171-179.
- Heidin, C.-M., and W. Szymanski. 1980. Signal transduction by a receptor for platelet-derived growth factor. *J. Cell Sci.* 96:193-196.
- Seifert, R., E. W. Raines, D. F. Bowen-Pope, J. C. Bonner, J. M. Kelly, J. Murray, and D. F. Bowen-Pope. 1989. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 264:171-177.
- Hart, C. E., J. W. Forstrom, J. D. Kelly, R. A. Seifert, R. A. Smith, R. Ross, N. M. Murray, and D. F. Bowen-Pope. 1987. Two classes of PDGF receptor recognize different forms of PDGF. *J. Biol. Chem.* 262:1529-1531.
- Shimobado, K., E. W. Raines, D. K. Matyas, T. B. Barrett, E. P. Benditt, and R. Ross. 1988. A significant amount of growth factor activity consists of at least two forms of PDGF. *Crit. Rev. Biochem. Cell Biol.* 14:277-286.
- Lasky, J. A., A. R. Brady, and J. C. Bonner. 1992. Rat lung fibroblasts are stimulated by platelet-derived growth factor (PDGF)- α 1 to proliferate *in vitro* by chrysotile asbestos fibers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:A796 (Abstract).
- Szegbahn, A., A. Hamacher, B. Watermeyer, and C. H. Heidin. 1990. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 167:128-132. *Crit. Rev. Biochem. Cell Biol.* 16:91-920.
- Vaahänen, F. S., A. Oksanen, A. Sieghart, H. Holmen, and C. Heidin. 1992. Neoplasia is a platelet-derived growth factor (PDGF) sensitive disease that allows discrimination of PDGF- α and - β receptor signals in cells expressing both receptors. *Int. J. Cancer.* 51:549-554.
- Kürner, R. K., R. A. Benez, and A. R. Brady. 1988. A homologue of platelet-derived growth factor produced by alveolar macrophages. *FASEB J.* 2:272-277.
- Falk, W., R. H. Godwin, and E. J. Leonard. 1980. A 48 well micro chemotaxis assembly for rapid, accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immunol. Methods.* 33:239-247.
- Protleitner, A. E., and A. H. Kang. 1988. Fibroblast chemotactants. *Mol. Cell Biochem.* 103:99-108.
- Zigmund, S. H., and J. G. Hirsch. 1973. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *Exp. Med.* 137:1-24(1).
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Bonner, J. C., A. L. Gondelli, P. G. Coin, and A. R. Brady. 1993. Chrysolite asbestos upregulates gene expression and production of α -receptors for platelet derived growth factor (PDGF)-A in rat lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 92:423-430.
- Saichand, G. 1989. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 514:600-671.
- Hart, C. E., M. Bailey, D. A. Curtis, S. Osborn, E. Raines, R. Ross, and J. W. Forstrom. 1990. Purification of PDGF-A β and PDGF-B β from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelet secretory granules. *J. Biol. Chem.* 265:10572-10576.
- Nagataki, J., B. C. Trapnell, and R. G. Crystal. 1990. Upregulation of platelet-derived growth factor-A and B gene expression in human alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 85:2023-2027.
- Vignaud, J.-M., M. Allain, M. Martini, M. Pech, R. Penet, and Y. Martinez. 1991. Platelet-derived growth factor (PDGF) and normal fibroblast growth factor (bFGF) specifically associated with intracellular microtubules, while both intracellular microtubules and alveolar epithelial cells express the α -subunit proto-oncogene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6:531-538.
- Perdue, T. D., and A. R. Brady. 1994. Distribution of TGF- β 1, fibronectin and smooth muscle cell actin in asbestos-induced rat pulmonary fibrosis in rats. *J. Neurochem. Cytoskeleton.* (In press).
- Han, J., M. Rouge, B. Wipf, B. Eggmann, F. Kaufmann, and W. Hunzelr. 1991. Platelet-derived growth factor (PDGF)-A and -B β have mitogenic and chemotactic activity and stimulate phosphoinositide turnover. *J. Cell. Physiol.* 140:295-304.
- Grotenbosch, G. R., A. Igarashi, R. Larson, Y. Soma, and M. Charette. 1991. Differential binding, biological and biochemical actions of recombinant PDGF-A, -B, and - β isoforms on connective tissue cells. *J. Cell Physiol.* 149:233-243.
- Ferri, G. A., K. H. Sangalli, R. A. Seifert, D. F. Bowen-Pope, J. D. Kelly, M. Murray, E. W. Raines, and R. Ross. 1990. Relative receptor derived growth factor receptor subunit expression determines cell migration to different dimeric forms of PDGF. *Growth Factors* 3:319-324.
- Sachinidis, A., R. Luchner, W. Vetter, D. Tappe, and J. Hoppe. 1990. Different effects of platelet-derived growth factor isoforms on rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 265:10218-10243.
- Matsu, T., P. H. Pierce, T. P. Fleming, J. S. Greenberger, J. W. LaRocca, and M. A. Spector. 1991. The effects of PDGF-A β and -B β on human α and β platelet-derived growth factor receptor cDNAs in the native heteromeric cell leads to functional coupling with mitogenic and chemotactic signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8314-8318.
- Watermeyer, B., A. Sieghart, C.-H. Heidin, and L. Clackson-Walsh. 1990. β -type receptor for platelet-derived growth factor mediates a chemotactic response by means of ligand-induced activation of the receptor protein-tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:128-132.
- Schöllman, C., R. Grugel, D. Tappe, J. Hoppe, J. Folkman, D. Martini, and M. A. Spector. 1992. Basic fibroblast growth factor stimulates the mitogenic potency of the platelet-derived growth factor (PDGF) isoforms by specific up-regulation of the PDGF α -receptor in vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 6:2178-2189.
- Centella, M., T. L. McCarty, W. P. Kusmit, and E. Canalis. 1992. Isoform-specific regulation of platelet-derived growth factor activity and its effect on osteoblast-matrix attachment. *Endocrinology* 130:1076-1084.
- Yamada, K. I., K. Kikuchi, E. A. Smith, E. C. LeRo, and T. Toyonowska. 1992. Selective upregulation of platelet-derived growth factor α -receptors by transforming growth factor- β in adenocarcinoma fibroblasts. *J. Exp. Med.* 175:111-116.
- Beattie, E. J., E. W. Raines, R. A. Seifert, D. F. Bowen-Pope, and R. Ross. 1989. TGF- β increases the number of binding sites for connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Crit. Rev. Biochem. Cell Biol.* 6:315-324.
- Grotenbosch, G. R., K. R. A. Benez, and D. F. Bowen-Pope. 1989. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on growth subunits by transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* 264:8120-8125.
- Lindrom, P. M., P. G. Coin, A. R. Osornio-Vargas, and J. C. Bonner. 1992. Alpha-1-induced proliferation and chemotaxis of rat lung fibroblasts by upregulation of the PDGF receptor α -subunit. *FASEB J.* 6:256A (Abstract).
- Raines, E. W., S. K. Dower, and R. Ross. 1989. IL-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-A. *Science* 243:393-396.
- Fabiani, J. P., M. Absher, J. N. Evans, and J. Kelley. 1992. Spontaneous production of PDGF-A chain homodimer by rat lung fibroblasts *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1184-1191.

ALFA LA PIGNA NO.