

00346

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

5

LA  $\alpha$ -TROMBINA Y LOS RECEPTORES  
TRANSMEMBRANALES ACOPLADOS A PROTEINAS G,  
A SISTEMAS DE TIROSINA CINASA Y LAS VIAS DE  
TRANSDUCCION DE SEÑAL QUE CONTROLAN LA  
PROLIFERACION CELULAR

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)  
P R E S E N T A :  
ADRIANA CONTRERAS PAREDES

DIRECTOR DE TESIS: DRA. NORMA A. HERNANDEZ RODRIGUEZ

296416

MEXICO, D. F.

2001



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.

## A MIS AMIGOS

♥A Mariano, por mostrarme lo cerca que puedes estar de una persona, aunque viva a miles de kilómetros de distancia.

♥A Rubén, Míma, Diana y Alex, por enseñarme el valor de la amistad.

♥A Tony, Antonio y Mireya, por mostrarme que los amigos, lo son aunque no convivan a diario, por hacer llevaderos y hasta divertidos los momentos más difíciles.

♥A Inés, por permitirme entender que para apreciar a alguien no necesitas mucho tiempo y por compartir conmigo el milagro de una nueva vida.

♥A Alma, por su apoyo incondicional y por enseñarme el valor de la honestidad.

♥A Chela, por su cariño y por escucharme en esos momentos difíciles

♥A Marichy, por sus consejos y por hacerme sentir útil.

## DEDICATORIA

♥ A DIOS, POR PERMITIRME CONOCERLE Y  
MANIFESTARSE GRANDEMENTE EN MI VIDA.

♥ A MIS PADRES, POR MOSTRARME QUE AUNQUE LAS  
COSAS NO SIEMPRE VAN BIEN, SU AMOR HACIA MI, ES  
INQUEBRANTABLE.

♥ A MI HERMANA CORAL, POR SU APOYO Y POR  
INFUNDIRME SU ENORME FORTALEZA.

♥ A MI HERMANA GABY, POR NO CANSARSE DE DARMEN  
SU AMOR.

## AGRADECIMIENTOS

A LA Dra. Norma Hernández , por su tiempo, dedicación y por permitirme aprender a su lado

A las Dra. Rebeca López y a la Dra. Isabel Soto, por su invaluable apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra Marcela Lizano, a la M en C. Catalina Trejo, a la Dra. Annie Pardo y al M en C. Luis Sánchez, por su tiempo y por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

## **INDICE DE CUADROS Y FIGURAS**

**Figura 1.** Interacciones entre las células que producen Factores de Crecimiento y sus receptores.

**Figura 2.** El ciclo de activación de las proteínas G.

**Figura 3.** Transducción de señal inducida por un receptor tipo tirosina cinasa

**Figura 4.** La casacada de activación de las MAPKs.

**Figura 5.** Vías de transducción de señal inducidas por la trombina.

**Figura 6.** Ejemplo de la validación del ensayo de proliferación celular.

**Figura 7.** Presencia de ERK1 y ERK2 inducida por la trombina en el tiempo.

**Figura 8 A).** Tanslocación del factor de translocación AP-1 inducida por la trombina 8 y 24 h.

**Figura 8 B).** Cuantificación densitométrica de la translocación del factor de transcripción AP-1 inducida por la trombina a las 8 y 24 h.

**Cuadro 1.** Efecto inducido por la hirudina en la proliferación celular de los fibroblastos IMR-90.

## INDICE DE GRAFICAS

**Gráfica 1.** Curva dosis-respuesta a la trombina en el tiempo.

**Gráfica 2.** Inhibición de la proliferación fibroblástica inducida por la trombina en presencia de la hirudina.

**Gráfica 3.** Curva dosis-respuesta a trombina en el tiempo.

**Gráfica 4.** Proliferación celular inducida por la trombina en presencia del Anti-PDGFR y la genisteína a las 48 h.

**Gráfica 5.** Proliferación celular inducida por la trombina a diferentes tiempo.

**Gráfica 6.** Proliferación celular inducida por la trombina en presencia del Anti-PDGFR $\alpha$  y la genisteína a las 8 h.

**Gráfica 7.** Curso temporal de la actividad de la PKC inducida por la trombina y el PDGF.

**Gráfica 8.** La participación específica de la trombina a la actividad de la PKC a los 5 min.

**Gráfica 9.** La participación específica del PDGF a la activación de la PKC a los 10 min.

**Gráfica 10.** Proliferación celular inducida por la trombina en presencia del Anti-PKC a las 8 h.

**Gráfica 11.** Curso temporal de la activación de las ERKs 1/2 inducida por la Trombina y el PDGF.

**Gráfica 12.** La participación específica de la trombina a la actividad de las ERKs 1/2 a los 10 min.

**Gráfica 13.** La participación específica del PDGF a la actividad de las ERKs 1/2 a los 15 min.

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

GDP	Guanidina difosfato
GTP	Guanidina trifosfato
PLC	Fosfolipasa C
PinsP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol bifosfato
InsP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PKA	Proteína Cinasa A
MAPK	Cinasas activadas por Mitógenos
ERKs /12	Cinasas Extracelulares Reguladoras de Señal
JNK	Cinasas activadas por estrés
PARs	Receptores activados por proteasas
PLA	Fosfolipasa A
PI3K	Fosfatidil inositol 3 Cinasa
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PDGFR	Receptor $\alpha$ del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
IGF-1	Factor de Crecimiento Semejante a Insulina 1
Anti-PKC	Péptido inhibidor de la PKC
Anti-PDGFR	Anticuerpo monoclonal contra el receptor $\alpha$ del
ITS	Suplemento con Insulina, Trásferina y Celenio
PBS	Solución amortiguadora de Fosfatos

**INDICE GENERAL**

RESUMEN ..... 4  
INTRODUCCIÓN..... 5

**CAPITULO 1**

**ANTECEDENTES**

I. Factores de Crecimiento..... 8  
II. Receptores asociados a proteínas G..... 10  
III. Receptores tipo tirosina cinasa..... 11  
IV. Proteínas cinasa activadas por mitógenos..... 14  
V.  $\alpha$ -Trombina..... 15  
    A) Funciones..... 15  
    B) Receptor de la trombina..... 15  
    C) Señales de transducción inducidas por trombina..... 16  
VI. El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)..... 19  
    A) Funciones..... 19  
    B) Receptor de PDGF y su vía de transducción de señal..... 20  
VII. Transmodulación entre receptores acoplados a proteínas G..... 20  
    y tirosina cinasa

**HIPÓTESIS** ..... 23

**OBJETIVOS** ..... 24

**MATERIALES Y METODOS**

I. Cultivo celular..... 25  
II. Evaluación de la proliferación celular inducida por la trombina y el  
    PDGF..... 25  
    A) Validación del ensayo de proliferación celular..... 27

III. Determinación de intermediarios de la transducción de señal inducida por la trombina y el PDGF.....	28
A) Evaluación de la actividad de PKC .....	28
B) Evaluación de la actividad de ERK1/2 .....	30
C) Evaluación de la presencia de ERK1/2.....	31
<i>i)</i> Determinación de proteínas totales.....	32
<i>ii)</i> Inmunoprecipitación y separación de proteínas...	32
<i>iii)</i> Detección de ERK1/2 por quimioluminiscencia...	33
D) Detección del complejo de transcripción AP-1.....	33
<i>i)</i> Extracción de proteínas nucleares.....	34
<i>ii)</i> Ensayo de movilidad electroforética.....	34
E) Análisis estadístico .....	35

## RESULTADOS

I. Proliferación celular inducida por la trombina.....	36
A) Participación específica de la trombina a la proliferación celular de los fibroblastos IMR-90 a las 48 h .....	41
B) Participación específica de la trombina a la proliferación celular de los fibroblastos IMR-90 a las 8 h .....	44
II. Intermediarios de la transducción de señal inducida por la trombina y el PDGF.....	46
A) Activación de la PKC inducida por la trombina y el PDGF en el tiempo.....	47
B) Contribución específica de la trombina a la activación de la PKC en los fibroblastos IMR-90.....	49
C) Activación de las ERKs inducida por la trombina y el PDGF en el tiempo.....	53
D) Participación específica de la trombina a la activación de las ERKs 1/2.....	54

E) Participación específica de la trombina a la activación diferencial de las ERKs 1/2..... 57

F) Translocación del factor de transcripción AP-1 inducida por la Trombina..... 58

**DISCUSIÓN**

I. Proliferación celular inducida por la trombina y el PDGF en fibroblastos fetales de pulmón humano (IMR-90) ..... 62

II. Intermediarios de la transducción de señal inducida por la trombina y el PDGF..... 63

III. Aumento en la translocación del factor de transcripción AP-1 inducido por la trombina ..... 66

**CONCLUSIONES..... 70**

**BIBLIOGRAFIA ..... 72**

**RESUMEN**

La  $\alpha$ -trombina es una proteasa de serina, clave en la cascada de la coagulación; además, es inductor de un gran número de eventos celulares como: la proliferación, la quimiotaxis y la modulación del metabolismo de varias estirpes celulares. Esta proteasa, estimula la proliferación celular vía su receptor acoplado a proteínas G, e induce la síntesis de DNA vía la activación de la PLC $\beta$ 1, la Proteín cinasa C (PKC) y las Cinasas de Regulación Extracelulares (ERKs1/2). Aunque se ha sugerido que la actividad mitogénica inducida por la trombina se debe a una transactivación entre su receptor y los receptores tipo tirosina cinasa de otros factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el Factor Derivado de Plaquetas (PDGF), se ha determinado, que la trombina es capaz de inducir proliferación sin la participación del PDGF a tiempos menores de 28 h. Debido a lo anterior, en este trabajo se determinó el papel de la trombina en la proliferación celular, en la activación de intermediarios de la vía de transducción de señal (ERKs y la PKC), en el aumento en la translocación del factor de transcripción AP-1 y su posible independencia del mecanismo de señalización del receptor del PDGF, en la línea celular IMR-90. Para determinar la participación específica de la trombina, se empleó un inhibidor de la actividad tirosina cinasa; la genisteína y un anticuerpo específico para el receptor del PDGF (Anti-PDGFR). La trombina indujo un incremento significativo en la proliferación celular desde las primeras 8 h (42.12% $\pm$ 0.4 estimulación sobre medio control,  $p < 0.05$ ), una activación máxima de PKC (3.8 pmol/min/ $\mu$ g) a los 5 min, un incremento de hasta 10 veces en la actividad de las ERKs 1/2 ( $p < 0.05$ ). Específicamente se observó un incremento sostenido en la activación de ERK1. La translocación de AP-1 fue aumentada por la trombina a las 8 h. Ninguna de estas actividades se inhibieron con el Anti-PDGFR. Aunque encontramos que la actividad del PDGF fue similar a la inducida por trombina, este estimuló una activación de PKC y ERKs ligeramente retardada en tiempo. Estos datos sugieren, que en la línea celular IMR-90, tanto el receptor de la trombina, como el del PDGF, están acoplados a la vía de las ERKs; sin embargo, esta proteasa es capaz de inducir una vía de señalización independiente del receptor del PDGF.

## INTRODUCCION

La  $\alpha$ -trombina es una proteasa de serina, bien conocida como factor de la cascada de la coagulación<sup>1-3</sup> y que recientemente se ha caracterizado como factor de crecimiento, del que se ha demostrado su multifuncionalidad a nivel celular<sup>4</sup>. Esta puede modular en forma directa o indirecta, diferentes tipos de actividad biológica como la proliferación, la quimiotaxis y el metabolismo de diversas estirpes celulares<sup>5,6</sup>. Por lo que se ha sugerido su participación en el establecimiento de patologías como la metástasis<sup>7-9</sup> y algunos estados fibróticos<sup>10-11</sup>.

En cuanto a su mecanismo de acción a nivel celular, se sabe que la trombina ejerce su efecto a través de un receptor de membrana asociado a proteínas G<sup>12-13</sup>, que al activarse, inicia una cascada de transducción de señal. Ésta incluye entre otros, la activación de intermediarios tales como la PLC $\beta$ 1<sup>14</sup>, la PKC, las ERK1/2 y finalmente la activación de genes de respuesta temprana como *c-myc* y *c-fos*, los cuales forman el complejo de transcripción AP-1<sup>15</sup>.

---

Aunque se sabe que las ERK1/2 son intermediarios claves en la regulación de las señales mitogénicas inducidas tanto por receptores asociados a proteínas G, como los tipo tirosina cinasa<sup>16</sup>, no se ha determinado en forma clara el mecanismo mediante el cual la trombina es capaz de estimular la proliferación celular, incluso se ha propuesto que ésta no actúa en forma directa, sino que estimula la proliferación celular vía la secreción al medio de otros factores de crecimiento como el PDGF<sup>17</sup>. Así mismo, se ha propuesto además una transmodulación entre receptores tipo proteína G (semejantes a los de la trombina), y el receptor tipo tirosina cinasa del PDGF<sup>18</sup>.

En nuestro grupo de trabajo, se ha determinado que la trombina es capaz de inducir proliferación celular, sin la participación del PDGF a tiempos menores de 28 h, por lo que se esperaba que existiera una vía de transducción de señal

independiente, de la ya propuesta transmodulación entre los receptores proteínas G y los receptores tirosina cinasa.

Mediante el desarrollo del presente trabajo, se determinaron algunos intermediarios de la vía de transducción de la señal del receptor de trombina, para demostrar su posible independencia del mecanismo de señalización del PDGF.

A fin de demostrar el planteamiento anterior, se determinó la participación específica de la trombina y el PDGF en la inducción de la proliferación celular, empleando inhibidores específicos de la actividad biológica de cada uno de ellos (la hirudina y el anti-PDGFR $\alpha$ , respectivamente) y para demostrar la actividad tirosina cinasa con la proliferación celular inducida por trombina, se utilizó un inhibidor de esta actividad cinasa, la genisteína.

Para demostrar la vía de señalización que se activa en cada caso, se determinó la presencia de algunos intermediarios de la transducción de señal (la PKC, las ERK1/2), la participación de la actividad cinasa en la activación de dichos intermediarios inducida por la trombina, se determinó mediante el uso de la genisteína y de inhibidores específicos como el péptido inhibidor de la PKC. Así mismo y para evaluar la posible modulación inducida por la trombina a nivel genético, la translocación del factor de transcripción AP-1 inducido por la trombina, se determinó mediante un ensayo de retardamiento.

La trombina indujo un incremento significativo en la proliferación celular desde las primeras 8 h, la cual no pudo ser inhibida por el Anti-PDGFR. También, la trombina indujo una activación máxima de la PKC a los 5 min, así como un incremento de la actividad de ERK1/2. Específicamente, se observó un incremento sostenido en la activación de ERK1.

La translocación de AP-1 fue aumentada por la trombina a las 8 h. Ninguna de estas actividades tampoco se inhibieron con el Anti-PDGFR. Aunque encontramos que la actividad del PDGF fue similar a la inducida por trombina, se observó una activación de la PKC y ERKs ligeramente retardada en tiempo.

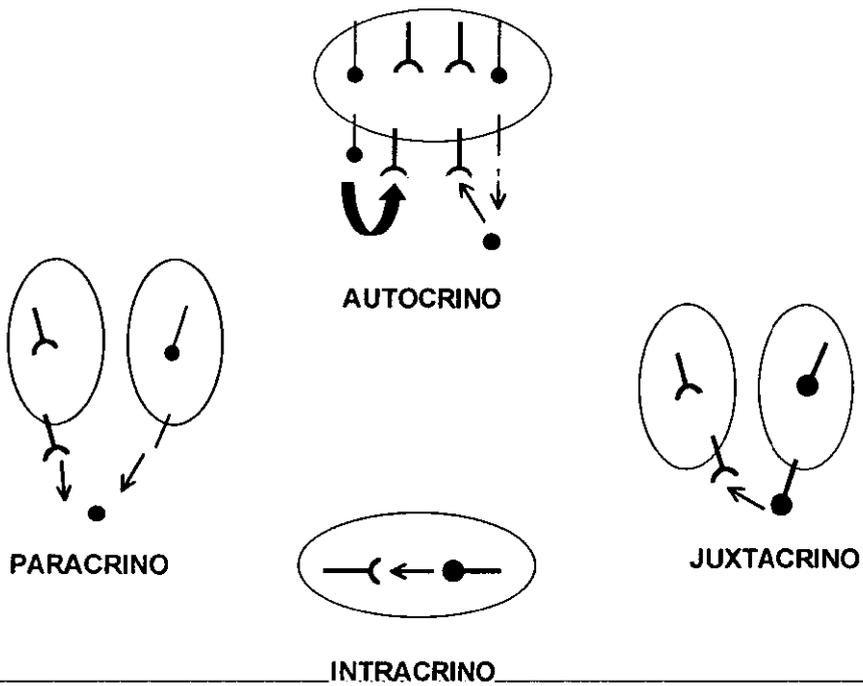
Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis, permitieron cumplir los objetivos planteados y nuestros resultados sugieren que el receptor de trombina y el PDGFR están acoplados a la vía de las ERKs e inducen la proliferación celular vía los mismos intermediarios pero probablemente, mediante mecanismos distintos en la línea celular de fibroblastos humanos IMR-90.

## ANTECEDENTES

### I. Factores de crecimiento

Las células reciben los estímulos externos a través de señales extracelulares, físicas y químicas. Estas últimas se agrupan dependiendo de que puedan o no pasar libremente a través de la membrana celular<sup>21-23</sup>. Los factores de crecimiento polipeptídicos como la trombina y el PDGF objeto de estudio de este trabajo, no atraviesan libremente las membranas celulares, y por lo tanto, ejercen su efecto a través de un receptor transmembranal<sup>23</sup>. Este receptor, esta generalmente compuesto por glicoproteínas integrales de membrana y posee alta afinidad por su ligando. La función principal del receptor, es la de convertir una señal extracelular (como la fijación de una molécula de un factor de crecimiento sobre la membrana de una célula blanco), en una señal intracelular (activación de una enzima), que a su vez, inducirá la activación de los genes necesarios para generar una respuesta celular específica<sup>24</sup>. Estos factores de crecimiento pueden actuar en forma autócrina (estimulando a la misma célula que las produce), parácrina (con acción sobre otras células vecinas), endócrina (ejerciendo su acción a distancia), intríntrica (ejerciendo su acción intracelularmente) y juxtácrina (en este caso el factor de crecimiento no es soluble) (Fig 1)<sup>25-26</sup>. Estos factores, pueden ejercer múltiples efectos (aún en la misma célula), en forma inmediata o tardía; e inducir la síntesis de otros factores de crecimiento, dando lugar a un fenómeno de cascada, y a mecanismos regulatorios de control positivo o negativo para modular una respuesta celular (proliferación, quimiotaxis, diferenciación, etc)<sup>24,27-28</sup>.

Debido a que la trombina ejerce su efecto celular a través de un receptor tipo proteína G<sup>29-31</sup> y a que se ha sugerido que ejerce su efecto de proliferación a través de una transmodulación vía el receptor tirosina cinasa del PDGF<sup>32-33</sup>, las características de ambos tipos de receptores serán descritas ampliamente a continuación.



**Figura 1. Interacciones entre las células que producen Factores de Crecimiento y sus receptores.**

Precursor del Factor de Crecimiento —●  
 Factor de Crecimiento soluble en el espacio extracelular ●  
 Receptor —C

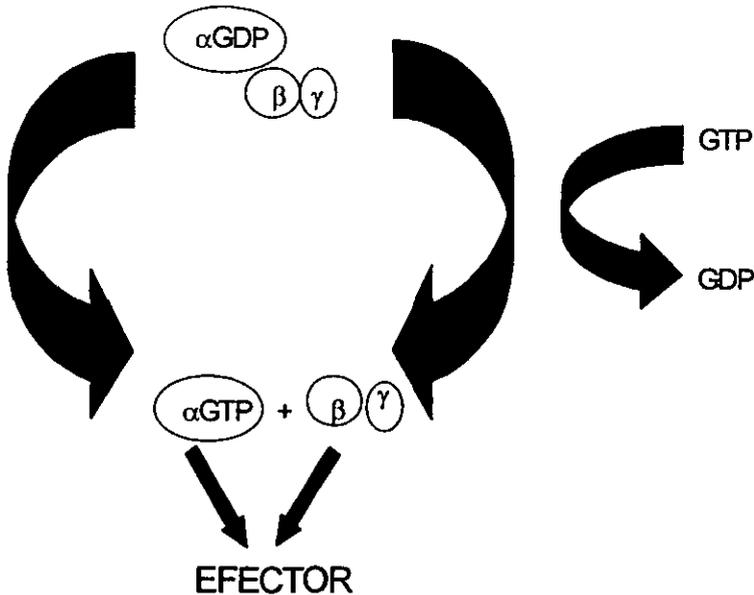
(Tomado de DeVita, *et al.*, 1997).

## II. Receptores asociados a proteínas G

Este tipo de receptores se asocia a un gran número de agonistas, tales como neurotransmisores, algunos mediadores de la inflamación<sup>34</sup> y ciertos factores de crecimiento, como la trombina. En general, estos receptores están formados por siete regiones helicoidales transmembranales, de las cuales tres están en posición intracelular, tres en posición extracelular, además de un carboxilo y amino terminal (en posición intracelular y extracelular respectivamente)<sup>1-36</sup>.

Para transducir las señales hacia el interior de la célula, estos receptores están acoplados a proteínas G, las cuales son proteínas heterodiméricas con capacidad de unión a GTP (Guanidina trifosfato), ó a GDP (Guanidina difosfato) constituidas por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ <sup>36-38</sup>. La subunidad  $\alpha$  posee 5 secuencias muy conservadas (G1 hasta G5). La secuencia G1 está involucrada en la unión de la subunidad  $\alpha$  al grupo fosfato y se ha visto que mutaciones en esta zona disminuyen la capacidad GTPasa de la proteína. La secuencia G2 es muy rica en treonina y está involucrada en la unión de esta subunidad con el complejo  $\beta\gamma$ . La secuencia G3 participa en los cambios conformacionales que presenta la proteína durante la sustitución del GDP por GTP y durante su hidrólisis. La región G4, está involucrada en la interacción de la proteína G con la adenilato ciclasa y finalmente la secuencia G5 participa en la unión de la subunidad  $\alpha$  a la membrana celular y podría interactuar indirectamente con nucleótidos de guanina<sup>39</sup>.

Las funciones principales del complejo  $\beta\gamma$  son moduladoras. Se sabe que mantienen a la subunidad  $\alpha$  en su estado inactivo, aumentando la afinidad de la proteína G por el receptor y, actualmente, se ha sugerido que este complejo está involucrado directamente en la activación de algunos efectores<sup>39-40</sup>. La activación de los receptores acoplados a proteínas G, en general, se realiza mediante un ciclo de unión e hidrólisis de GTP de la subunidad  $\alpha$ <sup>41</sup> (Fig 2).



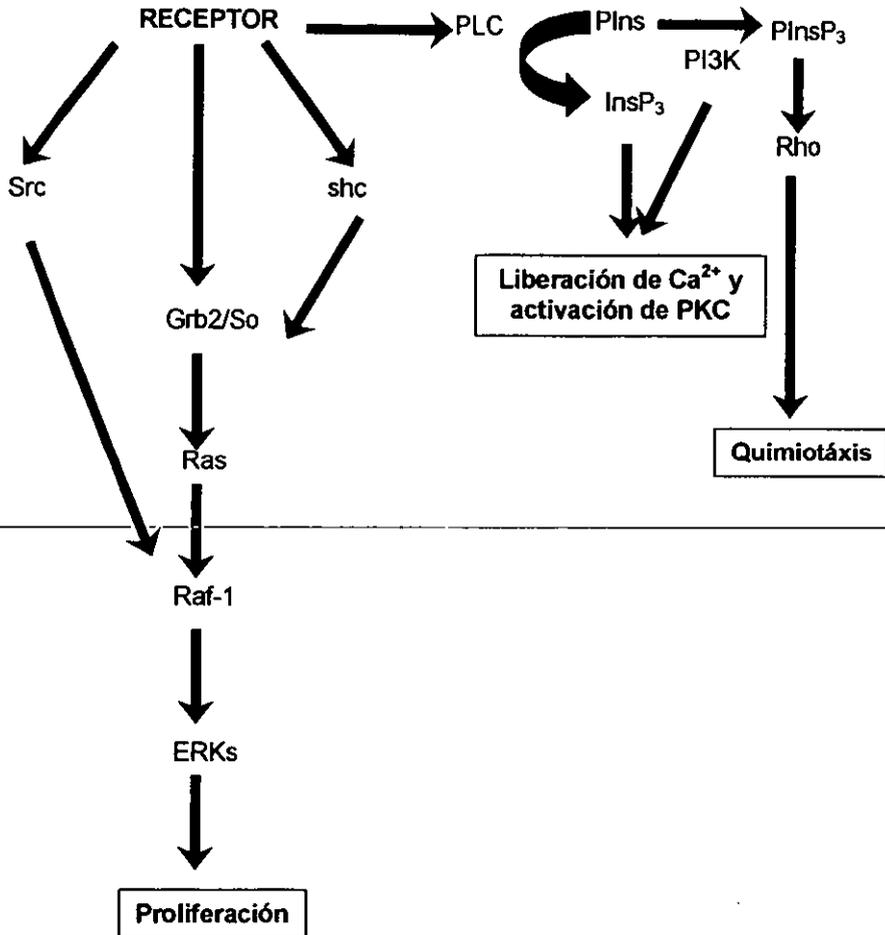
**Figura 2. Ciclo de activación de las proteínas G.**

En su estado inactivo la subunidad  $\alpha$ , tiene gran afinidad por el GDP y se encuentra unida al complejo  $\beta\gamma$ . La activación del receptor induce el intercambio de GDP por GTP, lo que produce la disociación del complejo  $\beta\gamma$  de la subunidad  $\alpha$  (Tomado de Spiege AM., 1992).

### III. Receptores tipo tirosina cinasa

Los receptores tipo tirosina cinasa, poseen varios residuos de tirosina que pueden autofosforilarse con la unión del ligando al receptor; cuando esto sucede, el receptor se autofosforila, dando como resultado residuos de fosfotirosina, los cuales actúan como un sitio de unión, altamente selectivo para proteínas con dominios SH2 (2 dominios homólogos a Src), o proteínas adaptadoras como Grb2<sup>23,42-43</sup>. Ambos tipos de proteínas son fundamentales para reclutar a otras

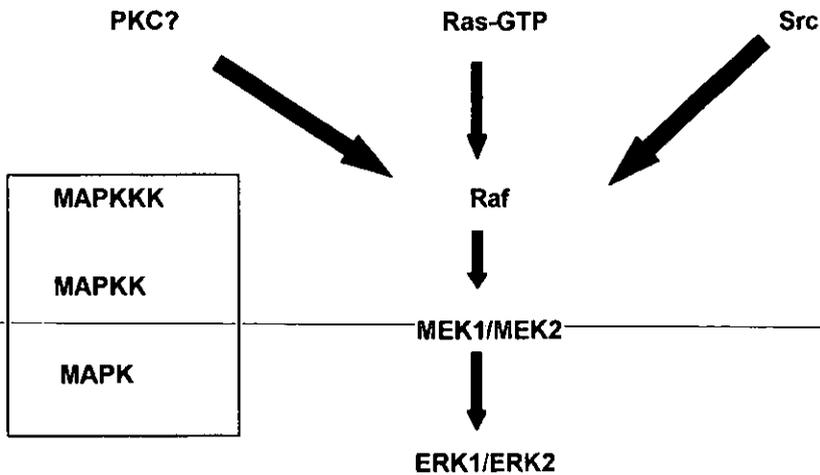
proteínas que se encuentran en la membrana citoplásmica, tales como Sos, que estimula la activación de pequeñas proteínas G, como es el caso de Ras (Fig 3)<sup>32</sup>. Éste a su vez induce la activación de proteínas de la familia de MAPK (Proteínas cinasas activadas por mitógenos) (Raf, MEK1/MEK2, ERK1/ERK2) (Fig 4)<sup>32</sup>.



**Figura 3. Señales de transducción inducidas por un receptor tipo tirosina cinasa. (Sugden., et al .,1997)**

Por otro lado, la autofosforilación del receptor, al unirse con su ligando, también produce sitios de unión para fosfatasas, como la fosfolipasa  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ), la cual hidroliza fosfolípidos membranales como el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI(4,5)P $_2$ ), produciendo inositol 1,4,5 trifosfato (IP $_3$ ) y diacilglicerol (DG)<sup>23</sup>.

El IP $_3$  libera el Ca $^{2+}$  de las cisternas intracelulares, mientras que el DG activa a la proteína cinasa C (PKC)<sup>44</sup> y ésta a su vez a Raf y con ésto a la cascada de las MAPKs<sup>29</sup> (Fig 3 y Fig 4).



**FIGURA 4. La cascada de activación de las MAPKs.**

Las MAPKKKs de la subfamilia de Raf, son activadas por procesos que podrían involucrar a Ras-GTP, c-Src o PKC. La fosforilación de Raf, fosforila a las MAPKKs: MEK1/MEK2, lo cual induce la activación de las MAPK: ERK1/ERK2.

(Tomado de Sugden., *et al.*, 1997).

#### IV. Proteínas cinasas activadas por mitógenos

Las MAPK son cinasas de serina/treonina, muy conservadas durante la evolución y representan un punto clave en las señales mitogénicas inducidas, tanto por receptores asociados a proteínas G, como los tipo tirosina cinasa<sup>16</sup>. Existen al menos tres familias de estas proteínas: Las cinasas de regulación extracelular (ERK1/2), las cuales fueron denominadas en un inicio como MAPKs; las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPKs o JNKs) y las MARKs p38<sup>32</sup>. Las ERKs, están íntimamente ligadas al crecimiento y a la diferenciación celular; mientras que las JNKs y las MARKs p38 están involucradas en la respuesta celular al estrés<sup>45</sup>.

La cascada de las MAPKs, esta constituida por una línea consecutiva de tres proteínas cinasas: la subfamilia MAPKKKs (a la cual pertenece Raf), la subfamilia MAPKKs (donde se encuentran MEK1/MEK2) y, finalmente, la subfamilia MAPKs, a la cual pertenecen las ERKs (Fig 4).

La subfamilia de las ERKs, está constituida por tres proteínas ERK1, ERK2 y ERK3<sup>45</sup>. La ERK1 (p44 MAPK) y ERK2 (p42 MAPK). Estas proteínas tienen actividad de serina/treonina cinasas y son fosforiladas por las MEKs. Estas cinasas fosforilan a su vez, a un gran número de sustratos como: la proteína fosfatasa 2C, proteínas involucradas en la señalización como la fosfolipasa A<sub>2</sub> y tirosina hidroxilasa; así mismo, estas cinasas son capaces de fosforilar a otras proteínas de la cascada de MAPKs, como raf y las MEKs (Fig 4)<sup>45</sup>.

La ERK3, aunque tiene una homología a nivel de secuencia del 50% con las otras ERKs, no comparte ninguno de sus sustratos y con respecto a su mecanismo de acción se conoce muy poco; pero a diferencia de las otras ERKs, que son citoplásmicas y cuando son activadas se translocan al núcleo, la ERK3 se encuentra constitutivamente en este organelo. Existen algunas evidencias, que apoyan la hipótesis de que estas cinasas podrían ser reguladas por receptores acoplados a proteínas G, especialmente los receptores de la familia de G<sub>q11</sub><sup>32</sup>.

## V. La $\alpha$ -TROMBINA

La  $\alpha$ -trombina es una proteasa de serina, que tiene un peso molecular de 37 kDa y consta de dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Es sintetizada por las células parenquimatosas del hígado, en forma de un zimógeno: la protrombina<sup>46-47</sup>. Esta proteasa, es una proteína globular, constituida por dos estructuras principales: un sitio activo, (conformado por tres aminoácidos His, Ser y Asp) y un exosito de unión aniónica, el cual interactúa con áreas ácidas del fibrinógeno, la fibrina, la hirudina y el receptor de la trombina<sup>47</sup>.

### A) Funciones de la trombina

La  $\alpha$ -trombina posee un papel multifuncional a nivel celular. Dentro de la hemostasis, esta proteasa actúa en la cascada de coagulación convirtiendo al fibrinógeno en fibrina<sup>1-2</sup> y activando la agregación de las plaquetas<sup>3</sup>.

Además, la trombina es capaz de inducir proliferación y quimiotaxis en células mesenquimatosas<sup>6,29</sup>. Otra función relevante de la trombina, es su capacidad para aumentar la síntesis de procolágena en fibroblastos de pulmón humano (HLF-1)<sup>48</sup>. Estas funciones enfatizan el papel de esta proteasa, en la iniciación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria y probablemente expliquen su relevancia en patologías relacionadas con la falta de control en la proliferación, la quimiotaxis o defectos en el metabolismo de colágena como la fibrosis pulmonar<sup>10-11</sup>, las neoplasias malignas y la metástasis<sup>7-9</sup>.

### B) Receptor de la trombina

La trombina ejerce su efecto a través de un receptor acoplado a proteínas G (específicamente  $G_q$  y  $G_{12}$ ), el cual está constituido por 429 aminoácidos y posee una estructura semejante a los otros receptores que pertenecen a la familia de proteínas G, antes descrita<sup>35-41</sup>. A diferencia de los demás receptores acoplados a proteínas G, para que el receptor de trombina se active, necesita que el sitio activo de esta proteasa se una al receptor y lo corte proteolíticamente en el sitio LDPR/

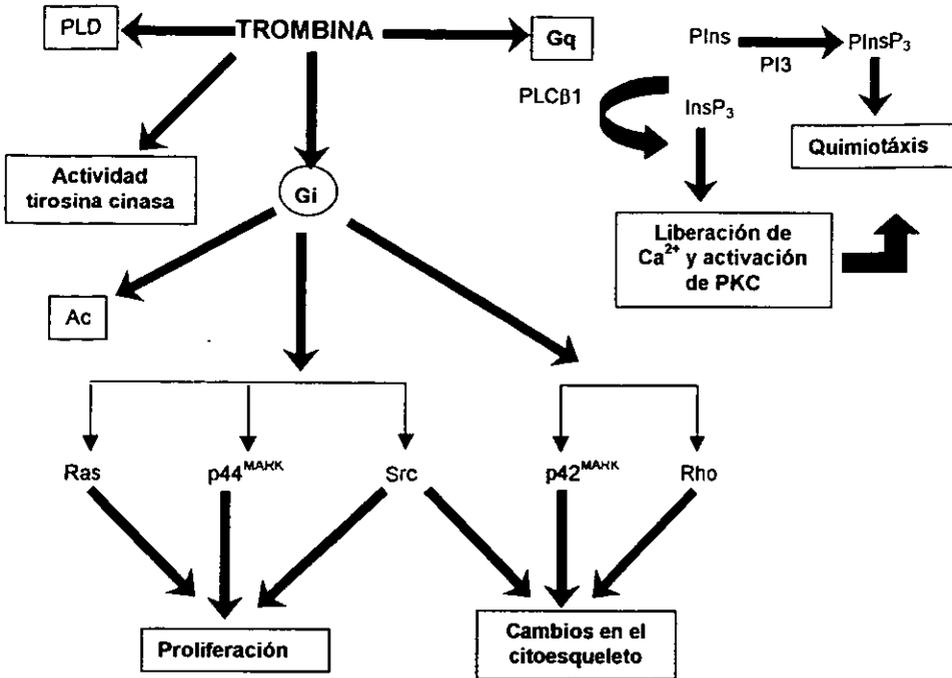
SFLL (específicamente entre la Arg-41 y Ser-42) del N-terminal, con este corte se descubre un nuevo grupo amino terminal que generalmente esta formado por el tetrapéptido SFLLRN; esto también genera, un cambio conformacional en el receptor, lo que le permite interactuar con el exosito de la trombina y con esto inducir una cascada de señalización<sup>12-13,49</sup>. Dentro de la familia de los receptores activados por proteasas como la trombina (PARs), se encuentran el PAR1, PAR2, PAR3 y PAR4, los cuales poseen entre sí una homología del 60%. El PAR1 y PAR3, responden a concentraciones nM de trombina, mientras que el PAR4 requiere concentraciones más altas<sup>3,50-51</sup>.

Existen varios mecanismos que podrían estar regulando la desactivación del receptor de la trombina; y al parecer están distribuidos de acuerdo al tipo de respuesta inducida por esta proteasa en cada estirpe celular<sup>35,47</sup>.

En algunas células, la trombina induce una respuesta lenta y sostenida, que implica la desactivación del receptor, su posterior degradación por lisosomas y la síntesis de *ново*; mientras que en otras, la respuesta es instantánea, lo que implica la existencia de receptores pre-sintetizados<sup>52-53</sup>.

### **C) Transducción de la señal inducidas por la trombina**

Debido a la multifuncionalidad de la trombina, cuando su receptor se activa, induce un gran número de señales de transducción (Fig 5)<sup>47</sup>, lo cual da como resultado las diversas actividades biológicas de esta proteasa.



**Figura 5. Diversas vías de transducción de la señal inducidas por la trombina** (Tomado de Grand R., *et al.*, 1996).

En fibroblastos de pulmón de la línea celular CCL39, se ha demostrado que la trombina mediante la proteína  $G_q$ , induce la activación de enzimas dependientes de fosfolípidos como la PLA y la PLC<sup>54</sup>; especialmente, esta proteasa activa a la PLC $\beta$ <sup>14</sup>. Esta enzima cataliza la hidrólisis de fosfolípidos transmembranales como el InsP<sub>2</sub>, generando segundos mensajeros como el diacilglicerol (DG) y el InsP<sub>3</sub><sup>55</sup>. Estos segundos mensajeros a su vez activan a la proteína cinasa C (PKC)<sup>56</sup>.

Cabe mencionar que el InsP<sub>3</sub> induce además, la apertura de canales de calcio y la liberación de este catión de las cisternas del retículo endoplásmico<sup>57-58</sup>. Así mismo, el InsP<sub>2</sub>, también induce la activación de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), la cual junto con la liberación del Ca<sup>2+</sup> está relacionada con la inducción de

quimiotáxis por la trombina<sup>59-60</sup>. Otra proteína involucrada en esta inducción es Rho, la cual participa en rearreglos del citoesqueleto, especialmente en la formación de fibras de estrés, así mismo, se ha visto que esta proteína podría estar involucrada indirectamente en la hidrólisis del  $PIInsP_2$ , mediante la activación de la  $PI3K$ <sup>59</sup>. Rho es capaz de modular la actividad de otros efectores como  $PLD$ <sup>54</sup>.

Con respecto a vía de la transducción de señal, que está involucrada en el efecto mitogénico inducido por la trombina, (Fig 5), se ha observado que se activan de proteínas acopladoras de la familia  $Src$ <sup>43,47</sup>, proteínas  $FaK$ <sup>47</sup>, la  $PKC$ <sup>56,61</sup>, las  $MAP$  cinasa<sup>62</sup> y pequeñas proteínas unidoras de GTP como  $Ras$ <sup>47,63</sup>. Al parecer, todos estos intermediarios son activados por la proteína  $G_{12}$ . Sin embargo, como ya se mencionó, la  $PKC$  puede ser activada también por la  $G_q$ , y se ha visto que la activación de esta cinasa, podría ser importante en la estimulación de las  $Src$ , por una fosforilación directa de estas proteínas en la  $Ser^{12}$ . Aunque la relación exacta entre estas dos vías diferentes de señalización, no se conoce<sup>47</sup>.

Otra vía mediante la cual la trombina induce la proliferación celular, es a través de la inhibición de la adenilato ciclasa; con lo cual se reduce la concentración del  $AMPc$  intracelular, y con esto la actividad de proteínas dependientes de éste, como la Proteína Cinasa A, que esta involucrada en la inhibición de la proliferación celular<sup>64</sup>.

Finalmente la trombina es capaz de fosforilar a las proteínas  $ERK1/ERK2$  (Fig 5), las cuales son fundamentales para la activación de genes de respuesta temprana como *c-jun* y *c-myc*, que juntos forman el factor de transcripción  $AP-1$ , el cual regula directamente la síntesis de  $DNA$ <sup>65</sup>.

La activación de las  $ERK1/2$  por la trombina, se da en forma diferencial; aunque en ambos casos, la activación máxima es a los 5 min. Dicha activación sólo se mantiene en el caso de la  $ERK1$ <sup>66</sup>. Con respecto al significado biológico de esta

activación diferencial, se ha observado que la fase de activación prolongada de la ERK1 correlaciona con la síntesis de DNA, mientras que la activación de ERK2 no participa en esta actividad<sup>66,67</sup>.

## VI. El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

El PDGF fue caracterizado por primera vez en 1974, como uno de los factores mitogénicos presentes en el plasma sanguíneo<sup>68</sup>. Debido a que este es sintetizado en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, se le nombró Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF); sin embargo, actualmente se conocen un gran número de células capaces de producirlo, como los macrófagos, las células endoteliales, las células del músculo liso y esquelético, células tumorales y fibroblastos activados<sup>69</sup>.

El PDGF es una glucoproteína catiónica que tiene un peso molecular de 30 kDa. Este factor de crecimiento es un potente estimulador de la proliferación y quimiotáxis de células del tejido conectivo, como los fibroblastos y las células de músculo liso<sup>60</sup>, pero también actúa en otras estirpes celulares como las células endoteliales y neuronales. El PDGF es una proteína dimérica que consta de dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas entre sí por puentes disulfuro, estas dos cadenas poseen entre sí el 60% de homología<sup>70</sup>. Dependiendo de la forma en que se unen dichas cadenas, se originan dos homodímeros (AA y BB) y un heterodímero (AB). Este factor de crecimiento ejerce su efecto a través de dos tipos de receptores tipo tirosina cinasa: el receptor  $\alpha$ , el cual no discrimina y se une con la misma afinidad a ambas cadenas polipeptídicas y el receptor  $\beta$ , el cual se une específicamente a la cadena B<sup>71</sup>.

### A) Funciones

Ambos receptores de este factor de crecimiento, median respuestas celulares similares. En los fibroblastos de pulmón, la activación de ambos receptores induce quimiotáxis; sin embargo, se ha demostrado que el receptor  $\beta$ , es mucho más eficiente, mientras que se ha comprobado, que el receptor  $\alpha$ , no solo no induce

quimiotáxis, si no que inhibe este efecto inducido por el PDGF-BB<sup>70</sup>. Con respecto a la movilización de  $Ca^{2+}$ , la activación del receptor  $\beta$  incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular considerablemente, mientras que el receptor  $\alpha$ , modula esta respuesta de forma negativa. La proliferación celular en fibroblastos parece entonces, estar modulada positivamente por el receptor  $\alpha$ <sup>70</sup>.

El PDGF como ya se mencionó, estimula la proliferación celular, la quimiotáxis, y que es secretado por las plaquetas y por otras estirpes celulares involucradas en la respuesta inflamatoria; por lo que podría desempeñar un papel muy importante en los procesos de reparación celular, en la proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario<sup>70</sup>. Finalmente el PDGF, está involucrado en el establecimiento de enfermedades en las cuales se presenta un aumento descontrolado en la proliferación fibroblástica y en la producción de matriz extracelular, como es el caso de la aterosclerosis y diferentes condiciones fibróticas<sup>33</sup>.

### **B) Receptor del PDGF y su vía de transducción de señal**

Después de la unión del PDGF a su receptor, se desencadena toda la vía de transducción de señal clásica de un receptor tipo tirosina cinasa, antes descrita<sup>72</sup> (Fig 3).

## **VII. Transmodulación entre receptores acoplados a proteínas G y tirosina cinasa**

Aunque se ha comprobado ampliamente el sinergismo entre receptores de factores de crecimiento pertenecientes a la misma familia<sup>73</sup>, la transmodulación entre receptores de diferentes tipos, como los asociados a proteínas G y los tirosina cinasa, no se conoce claramente. Sin embargo, se ha comprobado que la trombina, induce la fosforilación del receptor tipo tirosina cinasa de algunos factores de crecimiento como el PDGF, el EGF y el IGF-1<sup>18,73-74</sup>.

Mediante el empleo de fármacos específicos, se ha demostrado que la actividad del receptor tirosina cinasa del EGF, es necesaria para que el receptor de trombina induzca la síntesis de DNA, la activación de las MAPK<sup>18</sup>, y la expresión de *c-fos*<sup>75</sup>. Estas observaciones sugieren que la trombina sólo estimula al receptor del EGF y es este quién desencadena la activación de la cascada de las ERKs 1/2 y la síntesis de DNA<sup>18</sup>. Aunque la vía por la cual se da esta transmodulación entre estos receptores aun no se a dilucidado por completo, se sabe que proteínas como las que pertenecen a la familia Src, están involucradas<sup>76</sup>. También se ha observado que cuando la actividad de la PKC y c-Raf disminuye, la capacidad de los receptores acoplados a proteínas G para activar a las MAPK, también disminuye considerablemente<sup>74</sup>. Lo cual sugiere su participación en el proceso de transmodulación entre los receptores tipo proteína G y tirosina cinasa. Existe un gran número de evidencias que sugieren la participación de Ras en dicha transmodulación<sup>32,63,76</sup>.

Por otro lado, el hecho de que la trombina sea capaz de inducir la expresión, la síntesis y la secreción del PDGF al medio<sup>17</sup>, apoyan la hipótesis de que la trombina es capaz de inducir proliferación celular mediante la activación del receptor del PDGF y no por sí misma.

Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado que a tiempos menores o iguales a 28 h, esta proteasa es capaz de inducir proliferación celular sin la intervención del PDGF<sup>19,20</sup>. Por lo que mediante el desarrollo del presente trabajo, se determinó la relación entre el receptor de trombina y el receptor  $\alpha$  del PDGF. La contribución específica de la trombina en la proliferación celular de fibroblastos de pulmón humano, se determinó mediante la evaluación de la activación de diferentes intermediarios de la transducción de señal asociada a esta actividad biológica. La mejor comprensión de los mecanismos de señalización desencadenados por la unión de la trombina a su receptor (motivo de estudio del presente trabajo), así como el establecimiento de la relación entre algunos de estos eventos celulares y el incremento de la proliferación celular, no solo

permitiría la dilucidación de nuevas vías alternas de señalización del receptor de trombina, y su posible independencia de la transmodulación entre receptores acoplados a proteínas G y a los tipo tirosina cinasa, sino que además, podría proporcionarnos puntos clave para el control de la proliferación celular.

**HIPÓTESIS**

Si la  $\alpha$ -trombina es capaz de inducir proliferación celular, sin la participación del PDGF (a tiempos menores o iguales a 28 h), entonces es de esperarse, que exista una vía de transducción de señal inducida por la trombina, independiente de la ya propuesta transmodulación entre los receptores proteínas G y los receptores tirosina cinasa.

**OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la actividad mitogénica desencadenada por la trombina, se lleva a cabo por una vía de señalización diferente a la del PDGF.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la participación de la  $\alpha$ -trombina y el PDGF en la proliferación fibroblástica. La contribución específica de cada factor de crecimiento, se determinará mediante el empleo de sus inhibidores específicos (la hirudina y Anti-PDGFR).
- Determinar la activación de la PKC y las ERKs 1/2 inducida por la trombina y el PDGF. Correlacionar la activación de dichos intermediarios, con la proliferación celular inducida por la trombina y el PDGF, lo cual se evaluará mediante el empleo del Anti-PKC y la genisteína.
- Determinar la contribución específica de la actividad tirosina cinasa en la activación de la PKC y las ERKs inducida por la trombina y el PDGF, mediante el empleo de la genisteína.
- Cuantificar el aumento en la translocación del factor de transcripción AP-1, inducido por la trombina y el PDGF, y correlacionarla con la proliferación celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. Cultivo celular

Para el desarrollo del presente trabajo, se empleó la línea celular de fibroblastos fetales de pulmón humano IMR-90 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Estas células se crecieron en medio de cultivo (MEM, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Los cultivos celulares, se mantuvieron en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C. El MEM fue suplementado con glutamina (200 mM (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) y los antibióticos: penicilina (10 000 U) y estreptomycin 10 mg/ml) (Sigma, ST Louis, MD, USA).

En todos los experimentos que se desarrollaron en este trabajo, se emplearon cultivos sincronizados entre los pases 12 y 15. Una vez tripsinizados (tripsina al 2.5%), se sembraron en forma subconfluente en MEM adicionado con SBF al 1%, incubando durante 12 h para asegurar su adherencia a la placa. Después de 24 h de preincubación adicionales y en presencia del sustituto del suero el ITS (Insulina, Transferrina y Selenio), se iniciaron los experimentos. El ITS utilizado, proporciona a las células los nutrientes necesarios para su crecimiento, lo que elimina la presencia del gran número de factores de crecimiento contenidos en el SBF y que podrían enmascarar el efecto de la trombina durante los experimentos.

### II. Evaluación de la proliferación celular inducida por la trombina y el PDGF.

Para determinar el efecto de la trombina en la proliferación celular en la línea IMR-90, se empleó un método colorimétrico rápido y conveniente para el conteo de células cultivadas en placas de 96 pozos<sup>77</sup>; éste se basa en la penetración y posterior elusión del colorante azul de metileno (SIGMA, ST Louis, MD, USA).

El azul de metileno, es un colorante básico, el cual esta cargado positivamente a un pH=8.5. Este se une electrostáticamente a los grupos cargados negativamente dentro de las células, principalmente a los grupos fosfato de los ácidos nucleicos y algunas proteínas cargadas<sup>77</sup>.

Brevemente, las células se sembraron a una densidad de  $6 \times 10^3$  células/pozo. Pasadas las 36 h de pre-incubación se adicionaron las diferentes concentraciones de trombina pura (Sigma, ST Louis, MD, USA, en dobles diluciones desde  $0.16 \times 10^{-10}$  M hasta  $2 \times 10^{-10}$  M), del inhibidor específico de trombina (de  $0.7 \times 10^{-9}$  M a  $24 \times 10^{-9}$  M en dobles diluciones, Sigma, ST Louis, MD, USA), y de la genisteína<sup>78</sup>, ( $25 \mu\text{M}$  Sigma, ST Louis, MD, USA); o bien, de las mezclas de éstos, preparadas en medio MEM adicionado únicamente con ITS, se incubó durante 8 h, 24 h y 48 h. Una vez concluido el experimento, se eliminó el medio de cultivo y posteriormente se realizó un lavado sumergiendo la placa en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) en un ángulo de  $60^\circ$ . Una vez eliminado el PBS, las células se fijaron con  $100 \mu\text{l}$  de una solución de formol-salina al 10%, durante 30 minutos. Después de este tiempo, las células se tiñeron con  $100 \mu\text{l}$  del colorante azul de metileno (Sigma, ST Louis, MD, USA;  $0.5 \text{ mM}$ , preparado en una solución amortiguadora de boratos pH= 8.5). Posteriormente, se eliminó el colorante y el exceso de éste se enjuagó, sumergiendo la placa en solución amortiguadora de boratos ( $0.01 \text{ M}$ ) y el colorante que penetró a las células se eluyó con  $100 \mu\text{l}$  de alcohol ácido (etanol-HCl  $0.1 \text{ M}$ , 1:1). Finalmente, se determinó la absorbancia de el colorante eluído a  $650 \text{ nm}$ , empleando un espectrofotómetro para placas de 96 pozos (Multiskan, MCC/340). Los resultados se expresaron como el porcentaje de la estimulación observada sobre las células control.

Fibroblastos expuestos a MEM adicionado solamente con ITS y 10% de SBF, se emplearon como control negativo y positivo respectivamente. De cada experimento realizado se probaron en paralelo 6 réplicas de cada dilución de trombina o mezcla.

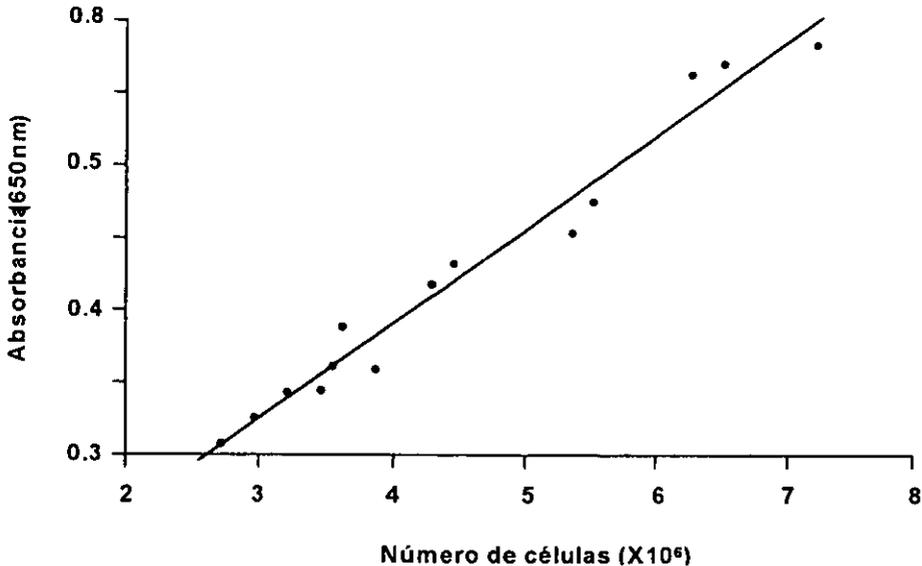
Como se mencionó en la sección de antecedentes para conocer la participación específica del PDGFR en la proliferación inducida por la trombina, se trabajó en paralelo con el PDGF.

Se determinó la concentración óptima de cada una de las formas estructurales del PDGF (AA, BB y AB) en la proliferación fibroblástica, mediante ensayos como los antes descritos para el caso de la trombina. Se emplearon diferentes concentraciones de PDGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (desde 2 ng/ml a 16 ng/ml en dobles diluciones).

Para determinar la transmodulación entre el receptor de esta proteasa y el receptor del PDGF y su participación en la proliferación celular, se empleó el Anti-PDGFR $\alpha$  (anticuerpo inhibidor de la actividad del receptor  $\alpha$  del PDGF) a una concentración de 1  $\mu$ g/ml.

#### **A) 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 (seleccionados al azar); se contó bajo el microscopio (con ayuda de una lente con cuadrícula) el número de células/pozo. Este resultado se correlacionó con las absorbancias cuantificadas anteriormente.



**Figura 6. Ejemplo de la validación del ensayo de proliferación celular.**

Las relaciones obtenidas presentaron un coeficiente de correlación Entre 0.97 y 0.99, y un valor de  $p < 0.05$ .

### **III. Determinación de intermediarios de la transducción de señal inducida por la trombina.**

Se evaluó la participación de la trombina en la activación de algunos intermediarios de la transducción de señal como: la PKC y las ERKs 1/2. En cada caso, se correlacionó dicha activación con la proliferación celular inducida por esta proteasa. Estos intermediarios también se evaluaron en el caso del PDGF, para determinar la posible existencia de una vía de transducción de señal independiente de la ya propuesta transmodulación entre los receptores tirosina cinasa y algunos receptores tipo proteína G, como el de trombina.

La evaluación de la actividad cinasa, se realizó mediante el empleo de un ensayo específico para cada enzima. En ambos casos, se cuantificó la actividad enzimática mediante la incorporación de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP a un sustrato específico.

En el caso del factor de transcripción AP1, su translocación al núcleo, se evaluó mediante el ensayo de movilidad electroforética (EMSA).

### **A) Evaluación de la actividad de la PKC**

Para determinar la actividad de la PKC, se empleó un ensayo (SAM<sup>2</sup>™ Protein Kinase C Assay System, Promega, Madison, USA), basado en la transferencia de  $^{32}\text{P}$  marcado a un sustrato específico para esta enzima, el cual es capturado en una membrana de fosfocelulosa<sup>79</sup>.  $5 \times 10^6$  células se sembraron en cajas de cultivo de 10 cm<sup>2</sup> con MEM suplementado con SBF al 1%. El experimento se inició agregando trombina ( $1 \times 10^{-10}$  M), PDGF AA (8 ng/ml), un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor  $\alpha$  de PDGF (1  $\mu\text{g/ml}$ ) o un péptido inhibidor contra la PKC (1  $\mu\text{g/ml}$ ), y sus combinaciones de éstos. Este experimento se realizó a 5, 10, 15, 30 y 60 min y con 3 réplicas de cada punto.

Al término del experimento, se aspiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con una solución amortiguadora de fosfatos pH=7 (PBS) fría y se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de una solución de lisis (50 mM de Tris/HCl (pH=7.5), EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM, triton X-100 0.05%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, leupeptina 1  $\mu\text{g/ml}$  y aprotinina 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células fueron removidas de la superficie de la caja de cultivo con ayuda de un gendarme y centrifugadas a 14 000 xg, 5min, 4°C, 1 ml del sobrenadante se paso a través de una columna de DEAE-celulosa, pre-equilibrada en buffer de lisis y finalmente, la columna se lavó con 5 ml de buffer de extracción con NaCl 200 mM, para eluir la fracción de la PKC.

Se llevaron a cabo ensayos de unión con: 5  $\mu$ l de buffer de coactivación (EGTA 1.25 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM y albúmina bovina 0.5 mg/ml), 5  $\mu$ l de buffer de activación (fosfatidilserina 1.6 mg/ml, diacilglicerol 0.16 mg/ml, Tris-HCl, 100 mM (pH=7.5), y  $\text{MgCl}_2$  50 mM), 5  $\mu$ l del péptido (Ala-Ala- Lys-Ile-Gln-Ala-Ser), y 5  $\mu$ l de la mezcla  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ATP (con una concentración 10 mCi/ml y una actividad de 3000 Ci/mmol). La reacción se agitó y se incubó 2 min a 30 °C, finalmente se agregaron 5  $\mu$ l de la fracción que contenía a la enzima y se incubó 5 min a 30 °C. Para parar la reacción, se agregaron 12.5  $\mu$ l de hidrocloreuro de guanidina 7.5 M. 10  $\mu$ l de esta muestra se gotearon en una membrana de fosfocelulosa, la cual fue lavada (1 vez x 30 seg y 3 veces x 2 min con 200 ml de NaCl 2M, 4 veces x 2 min con 200 ml de NaCl 2M en 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , finalmente 2 veces x 30 seg con 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  (desionizada).

Las membranas completamente secas se colocaron en un vial con 10 ml de líquido de centelleo y la cantidad de [ $\gamma$ -ATP] se cuantificó en un contador de centelleo (Pakard).

Los resultados se expresaron como pmol ATP/min/ $\mu$ g de proteína. La actividad enzimática medida en ausencia de la mezcla de fosfolípidos, se empleó como control.

### **B) Evaluación de la actividad de las ERKs.**

La actividad enzimática de esta cinasa, se evaluó por medio de la transferencia del [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP al grupo treonina de un péptido específico (Pro-Leu-Ser-/Thr-Pro)<sup>80</sup>, se empleó el ensayo p42/p44 MAP kinase enzyme assay system (Amersham LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England). 100 000 células se sembraron en placas de 12 pozos y se estimularon con trombina (1U/ml), PDGF (8 ng/ml), y sus inhibidores: la hirudina ( $6 \times 10^{-9}$  M), el Anti-PDGF $\alpha$  (1  $\mu$ g/ml), así como la genisteína (25  $\mu$ M), o bien, sus mezclas. Este experimento se realizó a 5, 10, 15, 30, 60 min y se realizaron 3 réplicas de cada punto.

Las células fueron lisadas en una solución amortiguadora (10 mM tris, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM de ortovanadato, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ M aprotinina, pH= 7.4). Los restos celulares se centrifugaron a 2500 xg por 20 min, 15  $\mu$ l del sobrenadante, así como 10  $\mu$ l del sustrato específico, se colocaron en un vial y la reacción se inició agregando 5  $\mu$ l de una solución de magnesio (cloruro de magnesio y hepes, pH=7.4) con [ $^{32}$ P] ATP (con una actividad de 200  $\mu$ Ci/ml y a una concentración de 2 mCi/ml). Esta mezcla se incubó durante 30 min a 30 °C.

Posteriormente, para detener la reacción se agregaron 10  $\mu$ l de ácido ortofosfórico 100 mM, se colocaron 30  $\mu$ l de ésta mezcla en una membrana de fosfoCelulosa, para eliminar el [ $^{32}$ P] ATP no unido al sustrato, ésta se lavó 2 veces con una mezcla de 250 ml ácido acético 1%.

Finalmente cada membrana se colocó en un vial con 10 ml de líquido de centelleo, y se cuantificó la actividad de las ERKs 1/2 en un contador de centelleo (Pakard). Los resultados se expresaron como el número de veces de estimulación observada en comparación con el control negativo, lo que correspondió a la actividad enzimática cuantificada en ausencia de la mezcla del lisado celular.

### **C) Evaluación de la presencia de las ERKs 1/2 en el tiempo**

Debido a que existen evidencias que sostienen una participación diferencial de las ERK1/2 en la proliferación celular inducida por trombina<sup>65</sup>, la presencia de las ERK1 y ERK2 se determinó a diferentes tiempos.  $5 \times 10^6$  células (IMR-90) se sembraron en cajas de 25 cm<sup>2</sup>, se estimularon con trombina ( $1 \times 10^{-10}$  M), su inhibidor, la hirudina ( $6 \times 10^{-9}$ ); la genisteína (el inhibidor general de la actividad tirosina cinasa) (25  $\mu$ M), así como las mezclas de éstos. Este experimento se realizó con 3 réplicas de cada punto y a 5, 10, 15, 30 y 60 min.

Al término del experimento, se aspiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con PBS frío y se agregaron 500  $\mu$ l de una solución de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, inhibidores de proteasas y aminopeptidasas como la pepstatina, bestatina, leupeptina y aprotinina, pH=7.4).

Las células fueron removidas de la superficie de la caja de cultivo con ayuda de un gendarme, el lisado celular se pasó varias veces a través de una jeringa de insulina y fue centrifugado a 10 000 xg, 10 min, a 4°C; se eliminó el sobrenadante y se cuantificaron proteínas totales.

### **i) Determinación de proteínas totales**

Las proteínas totales de los sobrenadantes se cuantificaron mediante el método del Bradford uso del colorante azul brillante de coomasie<sup>81</sup> G-250 (CB G-250, BioRAD, México). Este colorante reacciona con las proteínas formando un complejo estable que tiene una absorbancia máxima a 595 nm. Una solución estándar de albúmina sérica humana (1.4 mg/ml) (SIGMA, ST Louis, MD, USA), fue empleada para realizar una curva estándar en la que se probó un amplio intervalo de concentraciones (de 2.18  $\mu$ g/ml a 140  $\mu$ g/ml, en dobles diluciones).

El colorante diluído 5 veces se agregó a la muestra o estándares y se incubó a temperatura ambiente por 10 min; tiempo después del cual se midió la absorbancia, de cada muestra a 595 nm en un espectrofotómetro (Labomed, USA).

### **ii) Inmunoprecipitación y separación de proteínas**

Para la inmunoprecipitación de ERK1/2, se incubó 1 ml del sobrenadante (100  $\mu$ g de proteínas totales) con 10  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal (20  $\mu$ g anti-ERK1 y ERK2 (Santa Cruz, México), a 4°C, con agitación suave durante toda la noche. Posteriormente se procedió a lavar 4 veces con PBS y el botón celular final se

resuspendió en 40  $\mu$ l de solución amortiguadora 2X (1 ml de glicerol 100%, 0.5 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol, 3 ml de SDS 10%, 1.25 ml de tris-HCl 1M, pH=6.7 y 1 mg de azul de bromofenol). Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 12%, y se transfirieron por electrotransferencia a una membrana de nylon-nitrocelulosa (hybond-C, Amersham LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England) en una solución amortiguadora (glicina 40 mM, tris 50 mM y metanol al 25%), durante 30 min a 350 mA. La eficiencia de la transferencia se comprobó por la tinción del gel con una mezcla del colorante azul de coomasie R-250 (0.1% p/v, metanol 50% v/v, y ácido acético), durante 4 h.

### **iii) Detección de las ERKs 1/2 por quimioluminiscencia**

Los complejos ERK1-antiERK1 y ERK2-antiERK2 se detectaron mediante una reacción de quimioluminiscencia. El sistema usa luminol de diacilhidracida cíclica, misma que se oxida en presencia del anticuerpo secundario obtenido en conejo y conjugado con peroxidasa, la presencia de peróxido de hidrógeno genera la emisión de luz. Las membranas previamente incubadas con el anticuerpo secundario, se incubaron con luminol durante 1 min. Después de este tiempo, la emisión de luz se detectó exponiendo la membrana a placas de rayos X (Hyper Film ECL, (Amersham LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England).

Los tiempos de exposición fueron variables dependiendo de la intensidad de la señal de luz emitida. Las placas de rayos X se revelaron empleado un procesador de placas de rayos X automatizado (Kodak, X-OMAT, México).

### **D) Detección del complejo de transcripción AP-1**

Debido a que la proliferación celular es regulada por factores de transcripción, como el AP-1 (complejo formado por los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*), en esta última fase, se determinó la posible regulación inducida por la trombina a nivel genético de

la proliferación fibroblástica. Lo anterior se realizó, con un método comercial (Gel Shift Assay System) (Promega, Madison, Wisconsin, USA), el cual es específico para cuantificar y caracterizar factores de transcripción<sup>82</sup>. Este método se basa en el hecho de que los complejos DNA-mezcla de proteínas migran más lentamente en geles de poliacrilamida, que el DNA o la mezcla de proteínas solos.

### **i) Extracción de proteínas nucleares**

En este ensayo, las proteínas nucleares de las células estimuladas a diferentes tiempos (8 h y 24 h) con la trombina ( $1 \times 10^{-10}$  M), el PDGF (8 ng/ml), la genisteína (25  $\mu$ M) y las mezclas de éstos, fueron obtenidas de la siguiente forma: se lisó la monocapa celular con la ayuda de un gendarme y se centrifugó a 1500 rpm 5 min a 4°C, el botón celular se resuspendió en 100  $\mu$ l de una solución amortiguadora (Hepes 10 mM, pH=7.5,  $MgCl_2$  15 mM, 10 mM KCl, 0.5 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml leupeptina y 2  $\mu$ g/ml de aprotinina), se incubó 15 min en hielo, se adicionaron 5  $\mu$ l de NP-40 al 10% y se centrifugó a 2500 x g por 10 min a 4°C. Se elimina el sobrenadante (parte citosólica).

El botón se resuspendió vigorosamente en 30  $\mu$ l de solución amortiguadora (hepes 25 mM, pH=7.5, NaCl 400 mM, EDTA 1mM, 20% de glicerol, DTT 1mM, NP-40 al 0.1%, PMSF 0.5 mM y leupeptina 2  $\mu$ g/ml y se almacenan a -70 °C. Los extractos se normalizaron en un gel de acrilamida al 6%.

### **ii) Ensayo de movilidad electroforética**

Para el análisis de la movilidad del factor de transcripción AP-1, las fracciones que contenían las proteínas nucleares, fueron incubadas con oligonucleótidos específicos para AP1 (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA -3', 3'-GCG AAC TAC TCA GTC GGC CTT-5' marcados con [ $\gamma^{32}$ P] ATP, se llevaron a cabo ensayos de unión en 10  $\mu$ l: 5 $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 2  $\mu$ l de buffer de unión (glicerol 20%,

MgCl<sub>2</sub> 5nM, EDTA 2.5 mM, DTT, 2.5 mM, NaCl 250mM, Tris-HCl pH=7.5, poly(di-dc)-poly(di-dc) 0.25 mg/ml), 1 µl de extracto nuclear. Como control negativo se utilizaron las mezclas conteniendo los oligonucleótidos marcados, pero sin la presencia de los extractos nucleares.

Como control positivo se empleó una reacción con extractos nucleares de la línea celular Hela. Como competidor específico se empleó una reacción en presencia de oligonucleótidos específicos para el factor de transcripción AP2.

Las reacciones se incubaron 10 min en hielo y se agregó 1 µl del oligonucleótido marcado y después de incubarse 30 min a temperatura ambiente, se sometieron a un análisis electroforético, en geles de acrilamida-bisacrilamida al 6%, éstos se corrieron a 100 v, durante 3 h en solución amortiguadora de corrida TBE 0.5X (Tris-base, ácido bórico, EDTA 0.5 M).

Los geles se fijaron durante 1 h en una solución de fijación (ácido acético-metanol-agua, 1:1:1, posteriormente se colocaron en un papel filtro y se secaron al vacío, durante 3 h. La emisión de radiactividad se detectó exponiendo la membrana, a placas de rayos X (Hyper Film ECL, (Amersham LIFE Science, Chalfont, Buckinghamshire, England). El tiempo de exposición fue de 24 h a -70°C. Las placas de rayos X se revelaron empleado un procesador de placas de rayos X automatizado (Kodak, X-OMAT, México).

### **E) Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se empleó la prueba paramétrica de t de "Student" tomando una  $p > 0.05$  como significativa.

## RESULTADOS

### I. PROLIFERACION CELULAR INDUCIDA POR LA TROMBINA Y EL PDGF

El objetivo principal de este trabajo, es determinar una vía de transducción de señal inducida por la trombina independiente del receptor del PDGF, a la cual se le pueda atribuir la actividad mitogénica ejercida por esta proteasa en un gran número de estirpes celulares<sup>6,29,83</sup>. Así que se determinó la actividad mitogénica inducida tanto por la trombina, como por el PDGF en la línea celular IMR-90, así como la contribución específica de cada uno de estos factores de crecimiento a esta actividad biológica.

En las condiciones antes descritas, los fibroblastos fueron incubados con diferentes concentraciones de la trombina (de  $0.016 \times 10^{-10}$  M a  $2 \times 10^{-10}$  M) durante 24, 48 y 72 h, para definir el tiempo y la concentración óptima de acción de esta proteasa en la proliferación fibroblástica.

La trombina presentó un máximo en la estimulación de la proliferación fibroblástica a cualquiera de los tres períodos de tiempo probados ( $35.5\% \pm 0.9\%$  para 24 h,  $55.5\% \pm 1.26\%$  para 48 h y  $68.4\% \pm 0.7\%$  para 72 h) a una concentración de  $1 \times 10^{-10}$  M, (gráfica 1). Sin embargo, en la curva de 24 h, se observaron valores relativamente bajos, mientras que las curvas de 48 y 72 h, presentaron mayores porcentajes de estimulación.

Debido a que a las 72 h, se podrían empezar a generar otros factores de crecimiento que intervendrían en el sistema y que enmascararían, el efecto del factor de crecimiento a probar (la trombina o PDGF)<sup>84</sup>, se seleccionó el tiempo de 48 h, como el tiempo óptimo de las determinaciones posteriores. El resto de los experimentos de proliferación celular, que se presentan se desarrollaron a este período de tiempo y a una concentración de  $1 \times 10^{-10}$  M.

## RESULTADOS

### I. PROLIFERACION CELULAR INDUCIDA POR LA TROMBINA Y EL PDGF

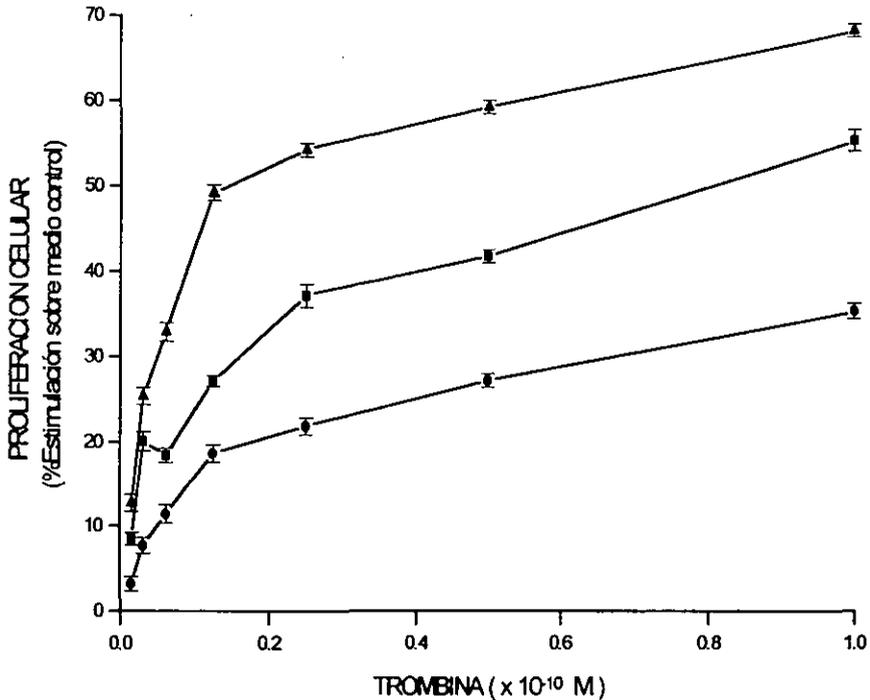
El objetivo principal de este trabajo, fue determinar una vía de transducción de señal inducida por la trombina independiente del receptor del PDGF, a la cual se le pueda atribuir la actividad mitogénica ejercida por esta proteasa en un gran número de estirpes celulares<sup>6,29,83</sup>. Así que se determinó la actividad mitogénica inducida tanto por la trombina, como por el PDGF en la línea celular IMR-90, así como la contribución específica de cada uno de estos factores de crecimiento a esta actividad biológica.

Los fibroblastos fueron incubados con diferentes concentraciones de la trombina (de  $0.016 \times 10^{-10}$  M a  $2 \times 10^{-10}$  M) durante 24, 48 y 72 h, para definir el tiempo y la concentración óptima de acción de esta proteasa en la proliferación fibroblástica.

La trombina presentó un máximo en la estimulación de la proliferación fibroblástica a cualquiera de los tres períodos de tiempo probados ( $35.5\% \pm 0.9\%$  para 24 h,  $55.5\% \pm 1.26\%$  para 48 h y  $68.4\% \pm 0.7\%$  para 72 h) a una concentración de  $1 \times 10^{-10}$  M, (gráfica 1). Sin embargo, en la curva de 24 h, se observaron valores relativamente bajos, mientras que las curvas de 48 y 72 h, se presentaron mayores porcentajes de estimulación en la proliferación celular.

Debido a que a las 72 h, se pueden generar otros factores de crecimiento en el medio de cultivo, que intervendrían en el sistema y que enmascararían, el efecto del factor de crecimiento a probar (la trombina o PDGF)<sup>84</sup>, se seleccionó el tiempo de 48 h, como el tiempo óptimo de las determinaciones posteriores. Los siguientes experimentos de proliferación celular se desarrollaron a este período de tiempo y a una concentración de  $1 \times 10^{-10}$  M.

En el control positivo (fibroblastos estimulados con MEM suplementado con SBF al 10%), se observaron valores de  $136.6\pm 2\%$ ,  $159.4\pm 3.6\%$   $189.2\pm 2.9\%$  de estimulación de la proliferación fibroblástica sobre el medio control a las 24, 48 y 72 h respectivamente.



**Gráfica 1. Curva dosis-respuesta a la trombina en el tiempo.**

Los fibroblastos fueron incubados a diferentes tiempos: 24 h (●), 48 h (■), 72 h (▲), con diferentes concentraciones de trombina. El medio control, corresponde a la proliferación celular observada en los fibroblastos incubados únicamente con MEM adicionado con ITS.

Con el fin de determinar la contribución específica de la trombina en el incremento de la proliferación fibroblástica determinada en el experimento anterior, se empleó un inhibidor específico de la trombina: la hirudina<sup>85</sup>. Por lo que primeramente, se estableció el efecto de este inhibidor en la proliferación fibroblástica por sí mismo;

posteriormente, se estableció la dosis óptima de inhibición de la hirudina sobre la proliferación inducida por la trombina, para lo cual, se trabajó con un amplio intervalo de concentraciones del inhibidor (de  $1.25 \times 10^{-11}$  a  $24 \times 10^{-9}$  M.), en presencia de la trombina ( $1 \times 10^{-10}$  M). En todas ellas, se observó una inhibición significativa de la proliferación celular inducida por esta proteasa (98% al 100%,  $p < 0.02$ ). Sin embargo, en ausencia de la trombina, estas dosis de la hirudina, indujeron una inhibición (1.34% al 8.68%) o una estimulación de la proliferación fibroblástica (1.54% a 8.54%) (cuadro 1).

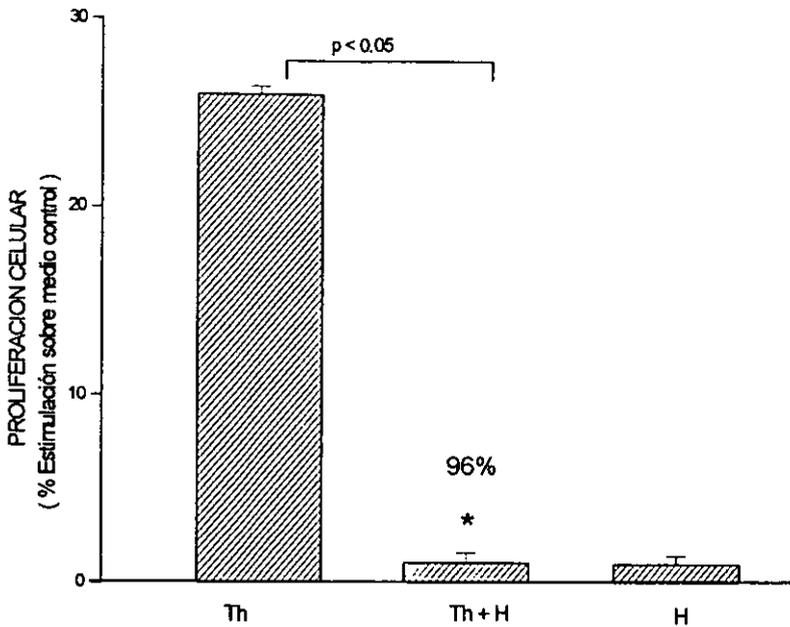
<i>Concentración de la hirudina ( M )</i>	<i>% Estimulación de la proliferación sobre el medio control</i>
$1.25 \times 10^{-11}$	8.68%
$2.50 \times 10^{-11}$	6.68%
$5 \times 10^{-11}$	5.22%
$1 \times 10^{-10}$	5.02%
$2 \times 10^{-10}$	4.10%
$4 \times 10^{-10}$	3.86%
$8 \times 10^{-10}$	3.60%
$1.6 \times 10^{-9}$	2.05%
$3 \times 10^{-9}$	1.89%
$6 \times 10^{-9}$	0.69%
$9 \times 10^{-9}$	-1.34%
$12 \times 10^{-9}$	-5.34%
$24 \times 10^{-9}$	-8.68%

#### **Cuadro 1. Efecto inducido por la hirudina en la proliferación celular**

Las células se incubaron 48 h con diferentes concentraciones de hirudina sola. El medio control, corresponde a la proliferación celular observada en los fibroblastos incubados con MEM adicionado con ITS.

Como se puede observar en el cuadro 1, la dosis de  $6 \times 10^{-9}$  M, no indujo ningún cambio significativo en la proliferación celular con respecto al medio control (0.69%). Sin embargo, como se observa en la grafica 2, esta dosis indujo una inhibición del

96%,  $p < 0.05$  en la proliferación celular inducida por la trombina, por lo que en el resto de los experimentos, se trabajó con esta dosis como la de inhibición óptima.



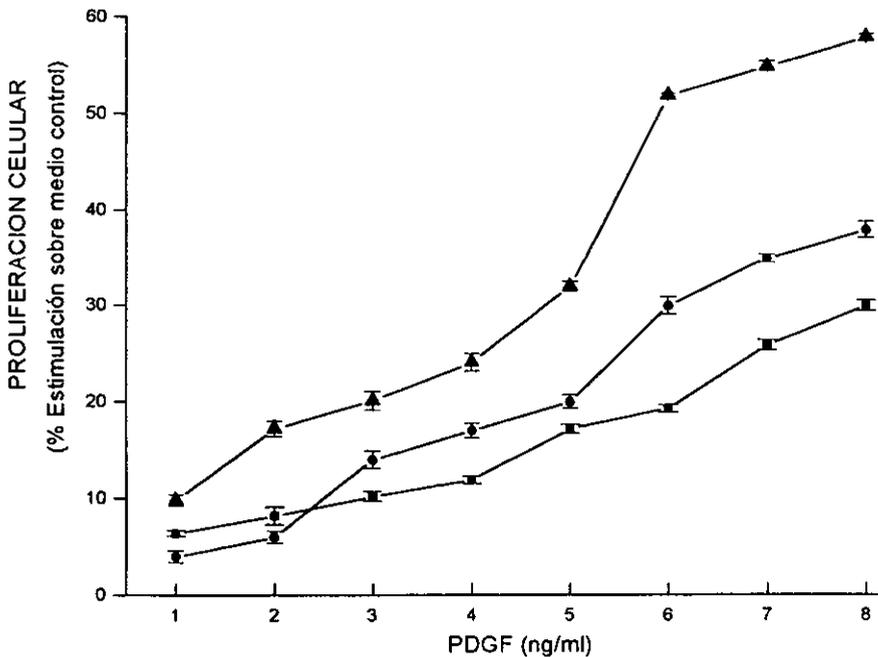
**Gráfica 2. Inhibición de la proliferación fibroblástica inducida por la trombina en presencia de la hirudina.**

Los fibroblastos fueron estimulados durante 48 h, en presencia de la trombina  $1 \times 10^{-10}$  M (Th), la hirudina ( $6 \times 10^{-9}$  M) sola (H) y las mezclas de trombina e hirudina. El medio control, corresponde a la proliferación celular observada en los fibroblastos incubados únicamente con MEM adicionado con ITS.

Algunos autores, han explicado el efecto de estimulación de la proliferación fibroblástica, inducido por la trombina a las 48 h, vía la liberación de otros factores de crecimiento como el PDGF y el  $TGF\beta$ <sup>17,86</sup>. Estos autores sostienen que la trombina

induce la expresión de algunos factores de crecimiento, así como su liberación al medio, de aquellos que se encuentran almacenados en forma latente en la matriz extracelular, siendo éstos los que estimulan la proliferación<sup>86</sup>.

Con respecto al papel mitogénico del PDGF, este ha sido ampliamente reportado; así como el efecto diferencial de cada una de sus formas estructurales (AA, AB, BB) en la proliferación celular<sup>87</sup>. Por lo tanto, en este ensayo se determinó la actividad de cada forma estructural de este factor de crecimiento a las 48 h en la proliferación celular de los fibroblastos IMR-90 (gráfica 3).



**Gráfica 3. Curva dosis-respuesta a trombina en el tiempo.**

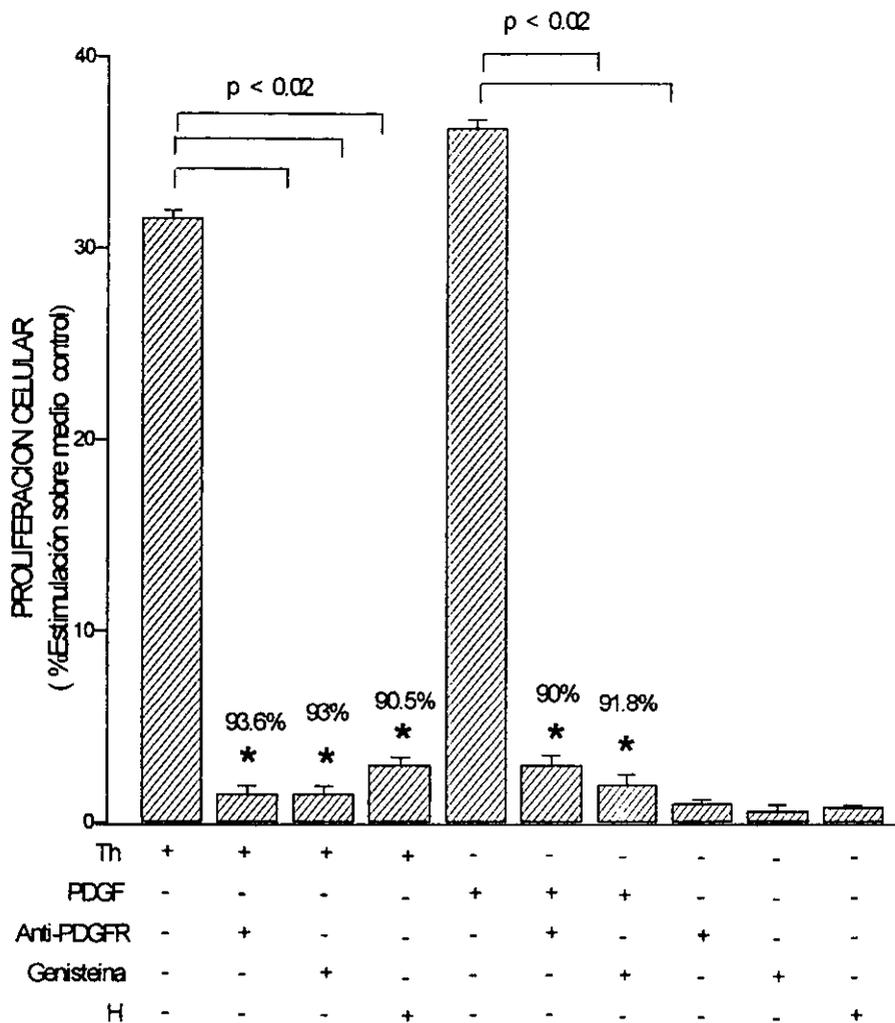
Los fibroblastos se incubaron durante 48 h, con las diferentes formas estructurales del PDGF (de 1 a 8 ng/ml), AA (▲), BB (■) y AB (●). El medio control, corresponde a la proliferación celular observada en los fibroblastos incubados únicamente con MEM adicionado con ITS.

Cada una de las formas estructurales del PDGF (AA, BB y AB), incrementaron significativamente y en forma dosis-dependiente la proliferación de los fibroblastos IMR-90, con respecto al medio control ( $p < 0.05$ ). La mayor estimulación se observó en el caso del homodímero PDGF-AA ( $58\% \pm 0.3$ ). Aunque los dímeros PDGF-BB y PDGF-AB, también estimularon la proliferación fibroblástica ( $38\% \pm 0.8\%$  y  $30\% \pm 0.5\%$  respectivamente), sólo se consideró la proliferación celular inducida por el homodímero AA en el resto del trabajo (1.5 a 3 veces mayor a la inducida por las otras formas estructurales). En este caso, el control positivo indujo una estimulación en la proliferación de los fibroblastos IMR-90 (sobre el medio control) de más del 130%.

#### **A) Participación específica de la trombina a la proliferación celular en los fibroblastos IMR-90 a las 48 h.**

En esta parte del trabajo, se intentó dilucidar el mecanismo por el cual, la trombina induce la proliferación celular observada en la parte anterior. Con respecto a este mecanismo de señalización, se ha propuesto que la trombina induce su efecto mitogénico, vía la trasmodulación de su receptor con el receptor tipo tirosina cinasa de otros factores de crecimiento como: el PDGF<sup>18</sup>. Sin embargo, existen evidencias a nivel de actividad biológica, que mencionan que la trombina es capaz de inducir proliferación, sin la participación del PDGF (a tiempos menores de 28 h)<sup>19,20</sup>.

A fin de dilucidar si la trombina en nuestra línea celular, era capaz de inducir un aumento de la proliferación por sí misma sin la participación del receptor del PDGF, se siguieron dos estrategias. Primeramente, se intentó inhibir la proliferación inducida por la trombina y el PDGF registrada a las 48 h, mediante el empleo de la hirudina, la genisteína y del Anti-PDGF $\alpha$  (gráfica 4). Posteriormente, se realizó una cinética de proliferación celular, a tiempos de incubación menores de 28 h. Esto con el objetivo de determinar algún efecto significativo en la proliferación celular a tiempos cortos, que pudiera ser atribuible directamente a la acción de esta proteasa.



**Gráfica 4. Proliferación celular inducida por la trombina en presencia del Anti-PDGFR y la genisteína a las 48 h.**

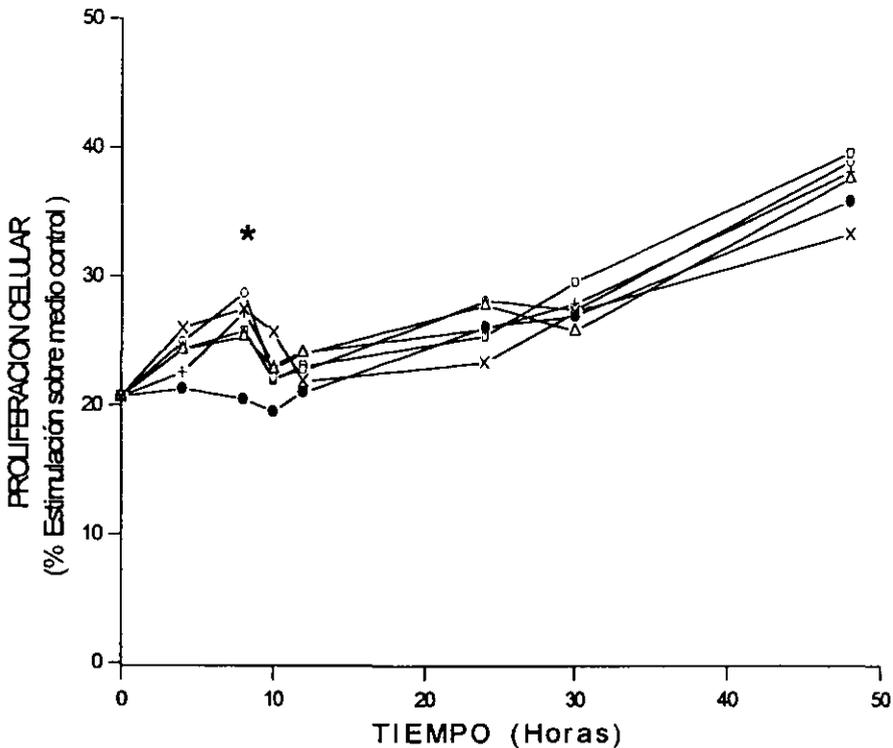
Los fibroblastos fueron estimulados durante 48 h en presencia de la trombina  $1 \times 10^{-10}$  M (Th), el PDGFAA 8 ng/ml (PDGF), la hirudina  $6 \times 10^{-9}$  M (H), la genisteína (25  $\mu$ M) y el Anti-PDGFR $\alpha$  (1  $\mu$ g/ml) Las mezclas de cada factor de crecimiento con los inhibidores son simbolizadas con +.

Como se puede observar en esta gráfica 4, después de 48 h de cultivo, la trombina ( $1 \times 10^{-10}$  M) indujo una estimulación de la proliferación en los fibroblastos IMR.90 de  $31.6\% \pm 0.4\%$  significativa, con respecto al medio control ( $p < 0.02$ ). La hirudina, el anti-PDGFR $\alpha$  y la genisteína inhibieron significativamente dicha proliferación ( $90.5\% \pm 0.4\%$ ,  $93.6\% \pm 0.4\%$  y  $93\% \pm 0.4\%$ ,  $p < 0.004$  respectivamente).

En el caso del PDGF, este fue capaz de inducir una proliferación fibroblástica del  $36.6\% \pm 0.4\%$  significativa con respecto al medio control ( $p < 0.05$ ), en presencia del Anti-PDGFR $\alpha$  y la genisteína, se observó una inhibición significativa ( $90\%$  y  $91.8\%$   $p < 0.005$ , respectivamente).

Una vez corroborado que el efecto de estimulación en la proliferación celular inducido por la trombina a las 48 h era mediado por el PDGF (lo cual correlaciona con lo reportado en la literatura), se intentó comprobar el efecto ejercido por esta proteasa a tiempos cortos, realizando una cinética de proliferación a tiempos menores (gráfica 5).

Como se puede ver en la gráfica 5, independientemente de la dosis de la trombina empleada (de  $0.06$  a  $1 \times 10^{-10}$  M), en los diferentes tiempos, se observó una tendencia semejante, destacando dos puntos de estimulación en la proliferación fibroblástica inducida por la trombina, a las 8 h y a las 48 h (punto ya determinado anteriormente). La estimulación de la proliferación celular en ambos casos, mostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a el medio control.

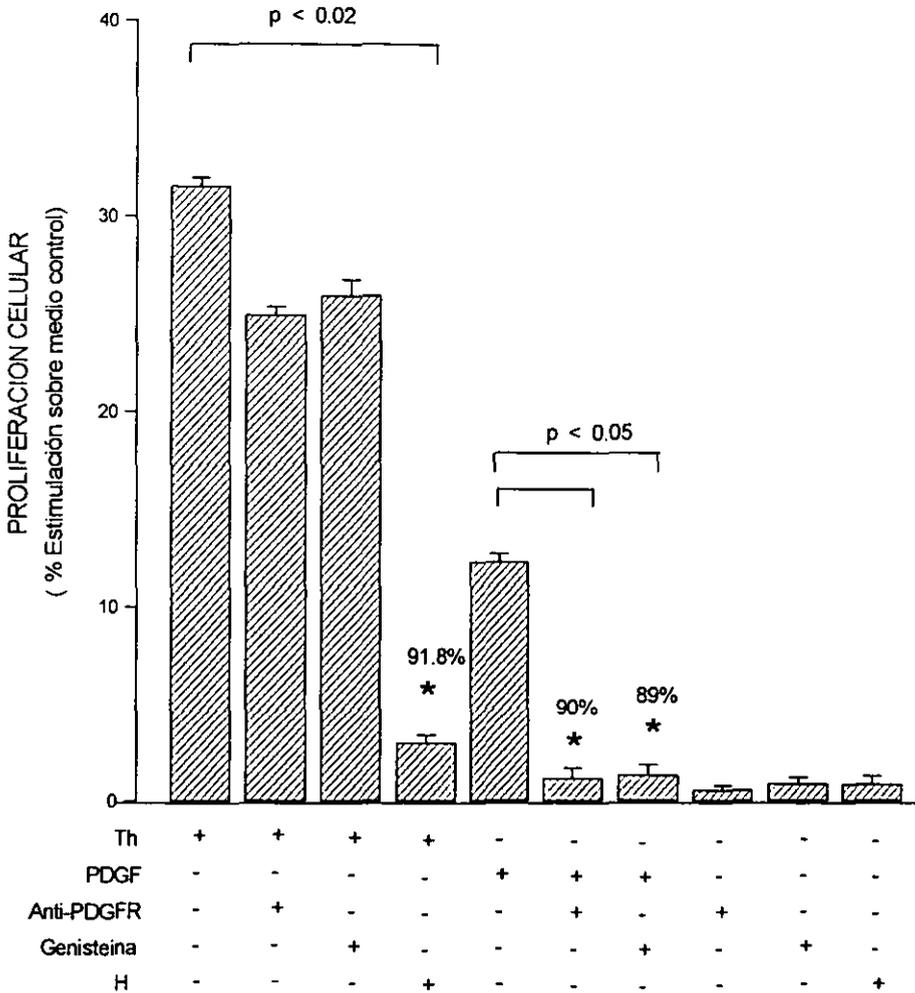


**Gráfica 5. Proliferación celular inducida por la trombina a tiempos cortos.**

Los fibroblastos fueron estimulados durante 4, 8, 10, 12, 24, 30 y 48 h en presencia de la trombina a diferentes concentraciones:  $0.06 \times 10^{-10}$  M (x),  $0.12 \times 10^{-10}$  M ( $\Delta$ ),  $0.25 \times 10^{-10}$  M ( $\circ$ ),  $0.5 \times 10^{-10}$  M y  $1 \times 10^{-10}$  M. El control negativo ( $\bullet$ ) son fibroblastos incubados con MEM suplementado unicamente con ITS.

### **B) Participación específica de la trombina a la proliferación celular en los fibroblastos IMR-90 a las 8 h.**

A fin de corroborar si el efecto de estimulación observado a las 8 h era atribuible solamente a la actividad de la trombina, se realizó un experimento como el que se muestra en la gráfica 4, pero ahora a este tiempo de estimulación (8 h).



**Gráfica 6. Proliferación celular inducida por la trombina en presencia del Anti-PDGFR $\alpha$  y la genisteína a las 8 h.**

Los fibroblastos fueron estimulados durante 8 h en presencia de la trombina  $1 \times 10^{-10}$  M (Th), el PDGFAA 8 ng/ml (PDGF), la hirudina  $6 \times 10^{-9}$  M (H), la genisteína (25  $\mu$ M) y el Anti-PDGFR $\alpha$  (1  $\mu$ g/ml). Las mezclas de cada factor de crecimiento con los inhibidores son simbolizadas con +.

La gráfica 6, muestra la proliferación celular inducida por la trombina a las 8 h (31.6%  $\pm$  0.4%), la cual fue inhibida significativamente sólo por la hirudina (91.8%  $p < 0.02$ ).

Para el PDGF se observó, una estimulación de la proliferación del 12.39% $\pm$ 0.4, sobre el medio control, la cual fue inhibida significativamente por el Anti-PDGFR $\alpha$  (90%,  $p < 0.05$ ) y la genisteína (89%,  $p < 0.05$ ).

Estos resultados sugieren que la trombina actúa induciendo la proliferación celular en la línea IMR-90, sin la participación del receptor del PDGF, ni de ningún receptor tirosina cinasa, en las primeras 8 h de cultivo. Después de este tiempo esta proteasa, puede actuar mediada por la transmodulación de su receptor con el receptor del PDGF u otros receptores tipo tirosina cinasa.

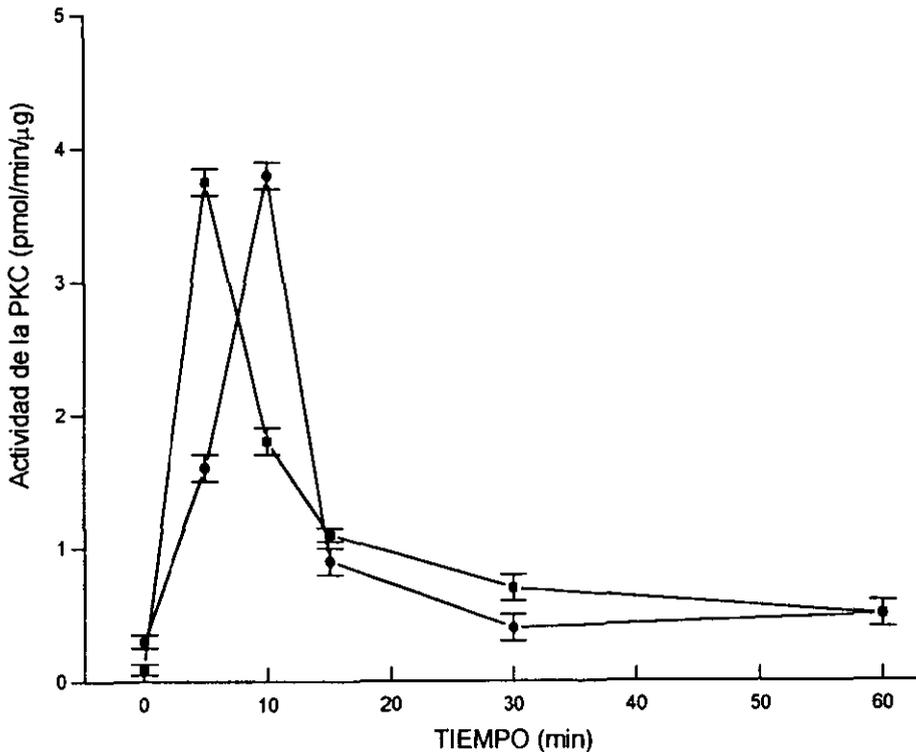
## **II. Intermediarios de la transducción de señal inducida por la trombina y el PDGF.**

Sobre la base de los resultados obtenidos en la sección anterior, en esta parte del trabajo, se trató de dilucidar la vía de señalización por medio de la cual, la trombina es capaz de inducir la proliferación celular observada a las 8 h. Así como verificar si dicha vía, era independiente de la propuesta transmodulación entre el receptor de esta proteasa y el del PDGF.

Aunque la vía de señalización involucrada en dicha transmodulación aún no se ha dilucidado claramente; la participación de las proteínas ERKs 1/2 representan un punto clave en las señales mitogénicas inducidas tanto por los receptores asociados a las proteínas G como por los tipo tirosina cinasa<sup>15</sup>, por lo que estas proteínas y la PKC<sup>18,56,61</sup>, se han propuesto como intermediarios importantes de esta vía de señalización. Por ello, se determinó el papel de la trombina y el PDGF en la activación de estas proteínas (las ERKs 1/2 y la PKC) a diferentes tiempos.

Para determinar lo anterior, primeramente se realizaron cursos temporales de la activación tanto de la PKC, como de las ERKs 1/2 inducida por la trombina y el PDGF. Posteriormente, se caracterizó la contribución específica de cada uno de estos factores de crecimiento a dicha activación.

#### A) Activación de la PKC inducida por la trombina y el PDGF en el tiempo



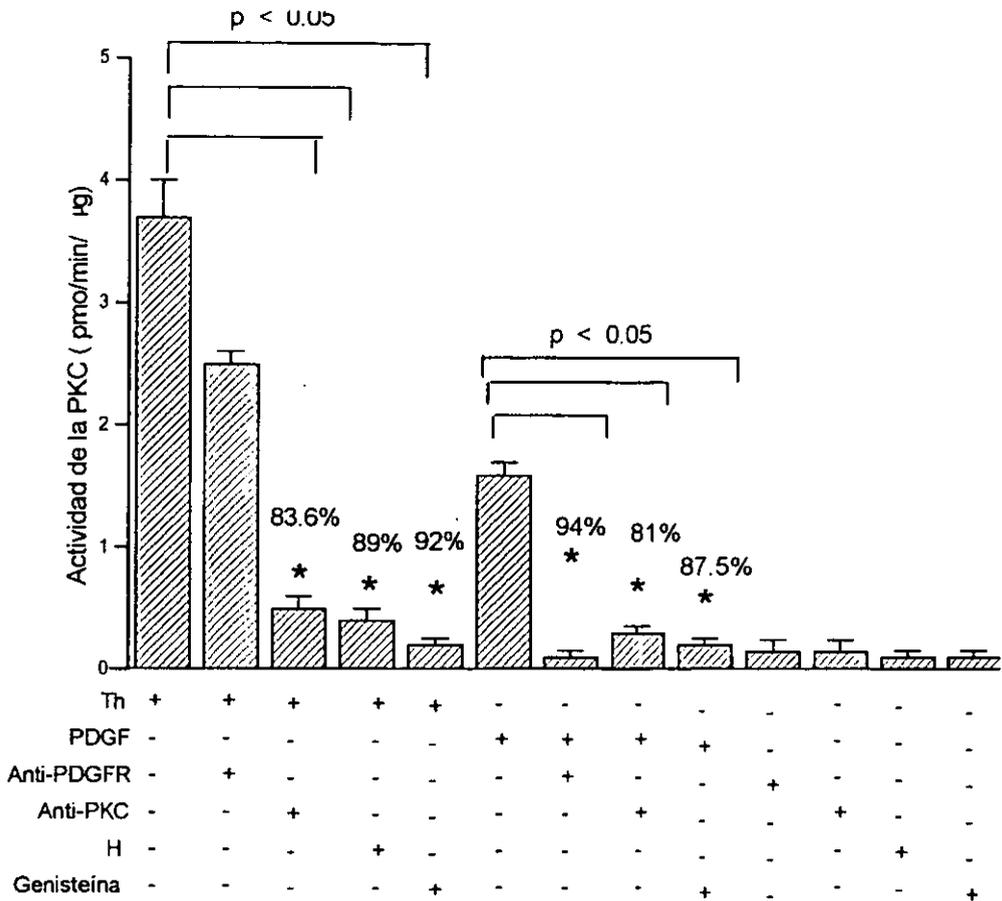
**Gráfica 7. Curso temporal de la actividad de la PKC inducida por la trombina y el PDGF**

Las células IMR-90, se estimularon con la trombina (■) ( $1 \times 10^{-10} M$ ), y el PDGF (●) (8 ng/ml) se determinó la actividad de la PKC a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min).

En la gráfica 7, se observó una actividad de la PKC en forma dosis-respuesta y tiempo dependiente; en ésta se muestra un pico de actividad máxima a los 5 min, inducido por la trombina ( $3.75 \pm 0.1$  pmol/min/ $\mu$ g), dicha actividad decayó después de 5 min hasta llegar a un nivel basal a los 60 min. En el caso del PDGF, se observó un comportamiento similar, pero el pico de actividad máxima ( $3.75 \pm 0.1$  pmol/min/ $\mu$ g), se obtuvo a los 10 min.

Para determinar la participación específica de la trombina y el PDGF en la inducción de la actividad de la PKC, observada en la gráfica 7, se realizó un ensayo al tiempo de estimulación máxima (5 y 10 min, para la trombina y el PDGF respectivamente).

**B) Participación específica de la trombina a la activación de la PKC en los fibroblastos IMR-90.**

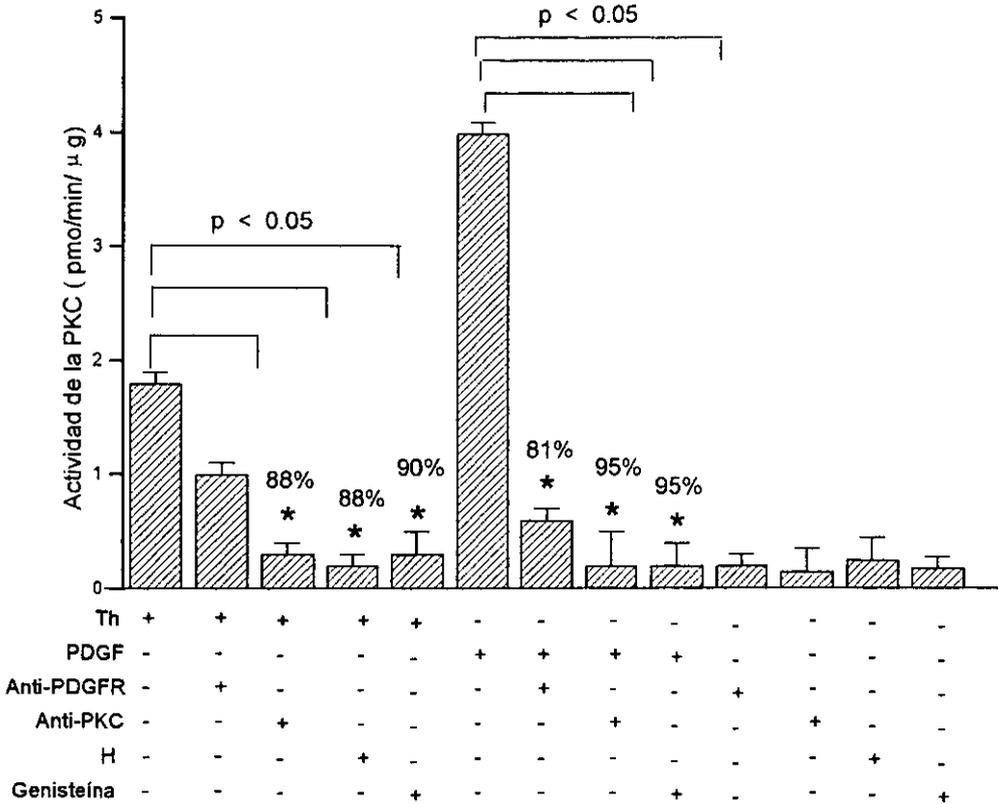


**Gráfica 8. La participación específica de la trombina a la activación de la PKC a los 5 min.**

Las células se estimularon durante 5 min en presencia de la trombina  $1 \times 10^{-10}$  M (Th), el PDGFAA 8 ng/ml (PDGF), la hirudina  $6 \times 10^{-9}$  M (H), el Anti-PKC (1 µg/ml) y la genisteína (25 µM).

Como se observa en la gráfica 8, la activación de la PKC inducida por la trombina ( $3.65 \pm 0.1$  pmol/min/µg), no es inhibida significativamente por el Anti-PDGFR, pero si por el Anti-PKC (83.6%,  $p < 0.05$ ), la hirudina (89%,  $p < 0.05$ ) y la genisteína (92%,

$p < 0.05$ ). En el caso del PDGF, coincidiendo con lo observado en la gráfica 7, éste sólo estimuló a los 5 min, la mitad de la actividad de la PKC inducida por la trombina ( $1.6 \pm 0.1$  pmol/min/ $\mu$ g), la cual fue inhibida totalmente por el anti-PDGFR $\alpha$ , el Anti-PKC y la genisteína (94%, 81% y 87.5%,  $p < 0.05$  respectivamente). A continuación se realizó un ensayo semejante, pero con un tiempo de incubación de 10 min (pico de actividad máxima en las células estimuladas con el PDGF, gráfica 9).



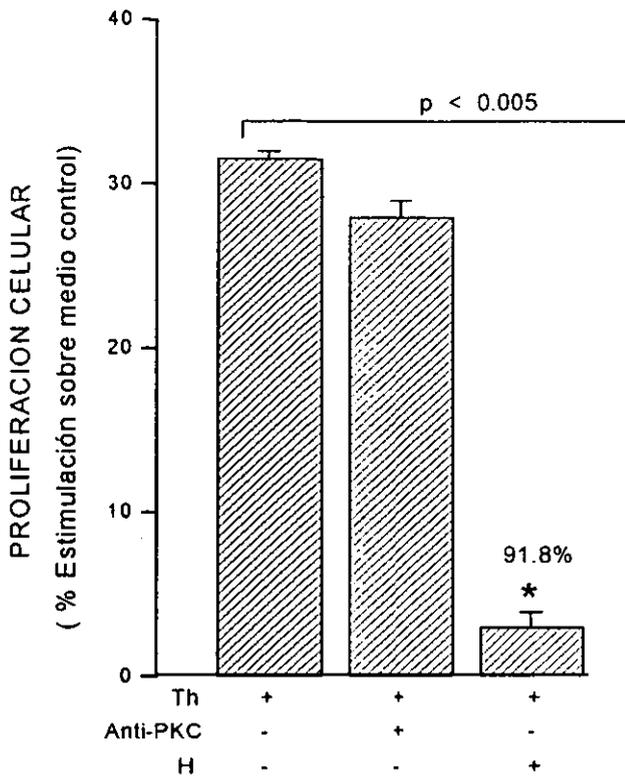
**Gráfica 9. La participación específica del PDGF a la actividad de la PKC a los 10 min.**

Las células fueron estimuladas durante 10 min en presencia de la trombina  $1 \times 10^{-10}$  M (Th), el PDGFAA 8 ng/ml (PDGF), la hirudina  $6 \times 10^{-9}$  M (H), el Anti-PKC (1  $\mu$ g/ml) y la genisteína (25  $\mu$ M). Las mezclas de cada factor de crecimiento con los inhibidores son simbolizadas con +

En la gráfica 9, se observa que el PDGF indujo una actividad máxima de la PKC ( $4 \pm 0.1$  pmol/min/ $\mu$ g), la cual fue inhibida por el Anti-PKC, la genisteína y el Anti-PDGFR $\alpha$  (95%, 95%, 81%,  $p < 0.05$  respectivamente). Bajo estas mismas condiciones, la trombina solo indujo una actividad de la PKC de  $1.8 \pm 0.1$  pmol/min/ $\mu$ g, la cual fue inhibida significativamente por el Anti-PKC (88%  $p < 0.05$ ), la hirudina (88%  $p < 0.05$ ) y la genisteína (90%  $p < 0.05$ ); pero el Anti-PDGFR $\alpha$  no fue capaz de inhibir significativamente la actividad de la PKC inducida por la trombina a este tiempo.

Estos resultados nos permiten deducir que en la activación de la PKC inducida por la trombina participa el receptor del PDGF, ya que el inhibidor de este receptor, fue capaz de bloquear parcialmente a ambos tiempos (5 y 10 min), la activación de la PKC inducida por la trombina; así mismo, se puede deducir la participación de otras proteínas con actividad tirosina cinasa como: las de la familia Src, ya que la genisteína fue capaz de inhibir totalmente la actividad de la PKC inducida por la trombina.

Debido a lo anterior, y a que la genisteína no fue capaz de bloquear la proliferación celular inducida por la trombina a las 8 h (gráfica 6), se puede deducir que al menos en la línea celular IMR-90 (empleada en este estudio), la PKC no participa en la proliferación celular inducida por la trombina; lo que se contraponen con lo reportado en otras líneas celulares<sup>56</sup>, en donde PKC, participa de forma importante en la inducción de dicha actividad biológica. Para comprobar lo anterior, se realizó un ensayo de proliferación celular a las 8 h, con la participación del Anti-PKC (gráfica 10).

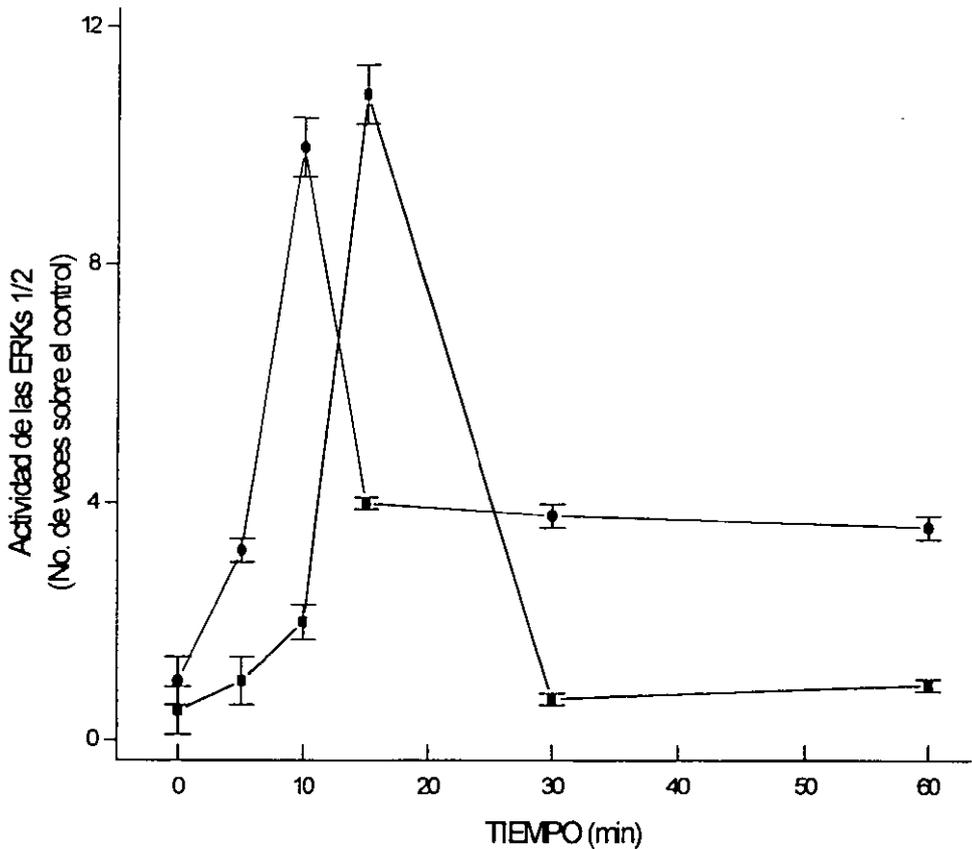


**Gráfica 10. Proliferación celular inducida por la trombina en presencia del Anti-PKC a las 8 h.**

Los fibroblastos fueron estimulados durante 8 h en presencia de la trombina  $1 \times 10^{-10}$  M (Th), la hirudina  $6 \times 10^{-9}$  M (H) y el Anti-PKC ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Las mezclas de cada factor crecimiento con los inhibidores son simbolizadas con +.

En la gráfica 10, después de 8 h de cultivo, la trombina ( $1 \times 10^{-10}$  M) indujo una estimulación de la proliferación fibroblástica ( $31\% \pm 0.4\%$ , significativa con respecto al medio control,  $p < 0.02$ ). El Anti-PKC no fue capaz de inhibir significativamente el efecto mitogénico de la trombina, lo cual nos permite confirmar que la actividad de la PKC, no participa directamente en la actividad mitogénica inducida por la trombina.

## C) Actividad de las ERKs 1/2 inducida por la trombina y el PDGF en el tiempo



**Gráfica 11. Curso temporal de la activación de las ERKs 1/2 inducida por la trombina y el PDGF.**

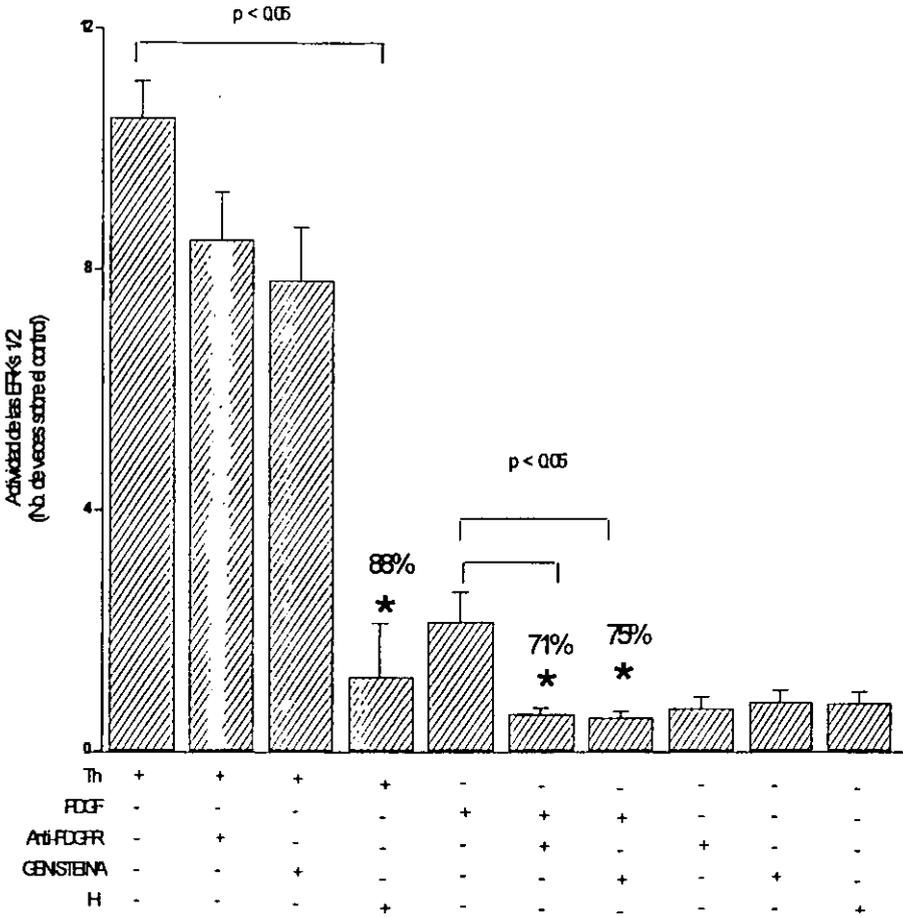
Las células se estimularon con la trombina (●) ( $1 \times 10^{-10}$  M) y el PDGF (■) (8 ng/ml). Se determinó la actividad de la ERK1/2, mediante la fosforilación del péptido Pro-Leu-Ser-/Thr-Pro, a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min).

En la gráfica 11, se muestra el efecto en la estimulación de las ERKs 1/2 inducido por la trombina y el PDGF en el tiempo. En el caso de la trombina, se observó un punto de estimulación máxima ( $10 \pm 0.5$ , veces sobre el control) a los 10 min, dicha actividad decayó a los 15 min y se mantuvo en un nivel basal hasta los 60 min.

El PDGF, indujo un comportamiento muy semejante al presentado en las células estimuladas con la trombina, sólo que en este caso, se observó el pico de estimulación máxima ( $10.9 \pm 0.5$  veces sobre el control), a los 15 min y dicha actividad decayó a los 20 min a un nivel basal menor al obtenido en el caso de la trombina.

#### **D) Participación específica de la trombina a la activación de las ERKs 1/2.**

Para determinar la contribución específica de la trombina y el PDGF, en la inducción de la actividad de las ERKs 1/2 (gráfica 11), se realizó un ensayo al tiempo de estimulación máxima de la trombina y el PDGF (10 y 15 min respectivamente).

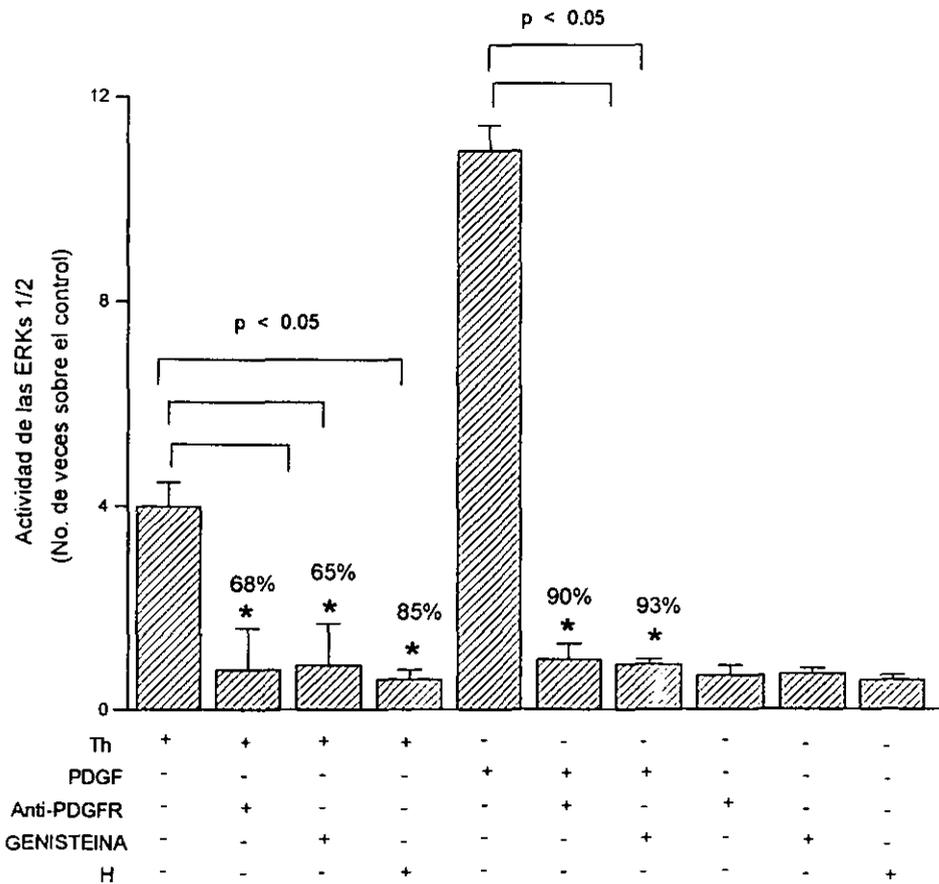


**Gráfica 12. La participación específica de la trombina a la actividad de las ERKs 1/2 a los 10 min.**

Los fibroblastos fueron estimulados durante 8 h en presencia de la trombina  $1 \times 10^{-10}$  M (Th), el PDGFAA 8 ng/ml (PDGF), la hirudina  $6 \times 10^{-9}$  M (H), la genisteína (25  $\mu$ M) y el Anti-PDGFR $\alpha$  (1  $\mu$ g/ml)..

Como se observa en la gráfica 12, la activación de las ERKs 1/2 inducida por la trombina ( $10 \pm 0.5$ , veces sobre el control), no fue inhibida significativamente por el Anti-PDGFR $\alpha$ (19%), ni por la genisteína (13.6%), pero si por la hirudina (88%,

$p < 0.05$ ). A este tiempo, el PDGF solo estimuló  $1.14 \pm 0.1$  (veces sobre el control), dicha actividad fue inhibida totalmente por el Anti-PDGFR $\alpha$  y por la genisteína (75% y 71%,  $p < 0.05$  respectivamente).



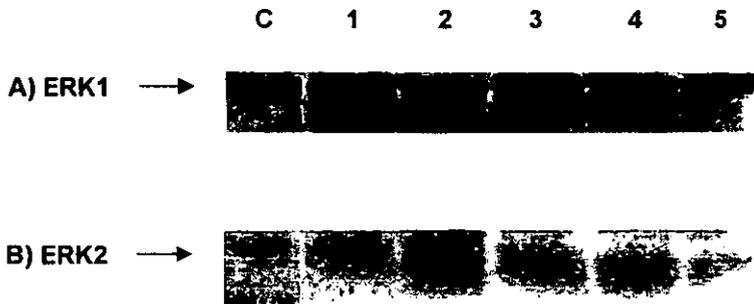
**Gráfica 13. La participación específica del PDGF a la actividad de las ERKs 1/2 a los 15 min.**

Los fibroblastos fueron estimulados durante 8 h en presencia de la trombina  $1 \times 10^{-10}$  M (Th), el PDGFAA 8 ng/ml (PDGF), la hirudina  $6 \times 10^{-9}$  M (H), la genisteína 25 ( $\mu$ M) y el Anti-PDGFR $\alpha$  (1  $\mu$ g/ml).

En la gráfica 13, se observa que la activación de las ERK1/2 inducida por el PDGF (8 ng/ml) en fibroblastos IMR-90 a los 10 min ( $10.97 \pm 0.5$  veces sobre el control), es inhibida significativamente por el Anti-PDGFR $\alpha$  (90 %  $p < 0.05$ ), y por la genisteína (95 %,  $p < 0.05$ ). A este tiempo, la trombina ( $1 \times 10^{-10}$  M) estimuló sólo  $4 \pm 0.4$  (No. de veces sobre el control), dicha actividad fue inhibida por el Anti-PDGFR $\alpha$  y la genisteína (68% y 65%,  $p < 0.05$  respectivamente).

**E) Participación específica de la trombina a la activación diferencial de las ERKs 1/2.**

Una vez determinada la activación de las ERKs por la trombina ( $1 \times 10^{-9}$  M) en forma conjunta, se observó la presencia de estas cinasas en cultivos de fibroblastos de pulmón IMR-90 de forma diferencial; debido a que, en la literatura, existen reportes que mencionan que una fase prolongada de activación de la ERK1 es necesaria para inducir la proliferación en células estimuladas con la trombina<sup>45,66,67</sup>.



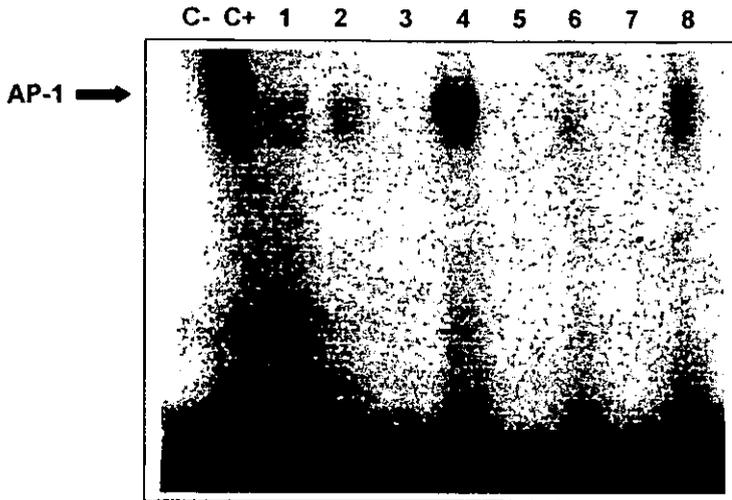
**Figura 7. Presencia de ERK1 y ERK2 inducida por la trombina en el tiempo.**

Las células fueron tratadas con la trombina ( $1 \times 10^{-10}$ ) a diferentes tiempos, 5 min (carril 1), 10 min (carril 2), 15 min (carril 3), 30 min (carril 4) y 60 min (carril 5). Como control (C), se utilizaron células no tratadas. Posteriormente, los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpos monoclonales para ERK1 (A) y ERK2 (B). Se realizó un inmunoblot con los mismo anticuerpos específicos.

En la figura 7, se observa que la trombina ( $1 \times 10^{-10}$ ), fue capaz de inducir un aumento en la presencia de la ERK1 a los 5 min, con respecto al control; posteriormente disminuyó, pero se mantuvo a una concentración mayor con respecto al control, hasta los 60 min. Con respecto a la actividad de la ERK2, ésta presentó un comportamiento muy similar, pero se observó en una proporción menor que la ERK1.

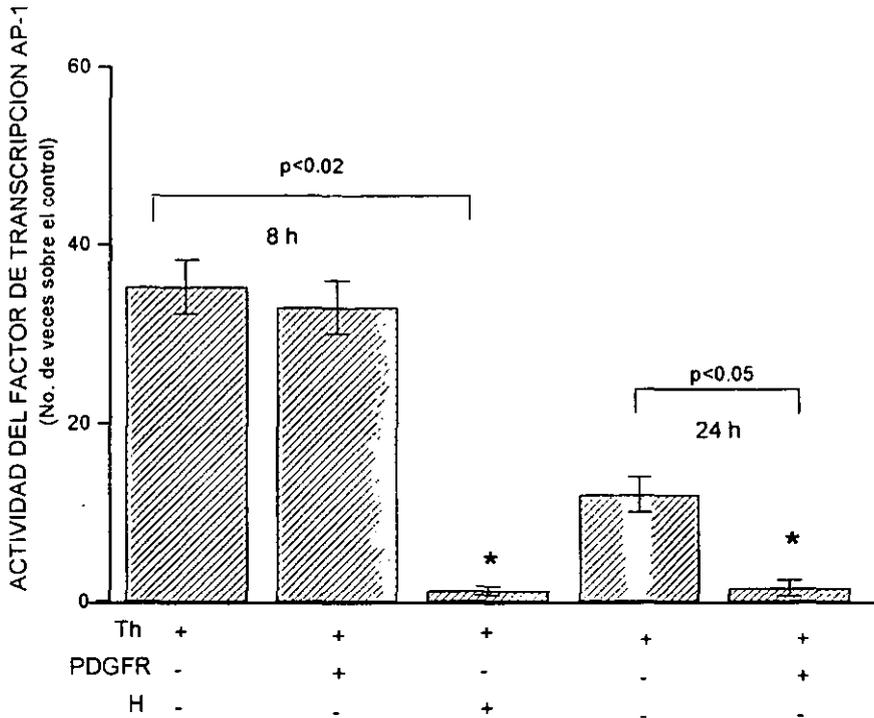
#### **F) Translocación del factor de transcripción AP-1 inducida por la trombina**

En este trabajo se determinó, que la trombina es capaz de inducir proliferación celular sin la participación del PDGF a las 8 h. Con respecto a la vía de señalización, se comprobó que la trombina es capaz de inducir una activación de las ERKs por sí misma a los 5 min, y que la activación de la PKC inducida por la trombina está mediada por alguna proteína con actividad tirosina cinasa; pero que esta activación, no participa directamente en la actividad mitogénica inducida por esta proteasa. Finalmente, se trató de correlacionar la actividad biológica de la trombina observada a las 8 h, con la capacidad de la trombina para inducir la activación del factor de transcripción AP-1.



**Figura 8 A).** Translocación de AP-1 inducida por la trombina a las 8 y 24 h.

Las fracciones nucleares de células estimuladas con la trombina ( $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ) a diferentes tiempos 8 y 24 h (carriles 4 y 6), con una mezcla de trombina e hirudina ( $6 \times 10^{-8} \text{M}$ ) a los mismos tiempos (carriles 5 y 8), fueron incubadas con oligonucleótido específico para AP-1 (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3', 3'-GCG AAC TAC TCA GTC GGC CTT-5). Como control positivo (carril C+), se emplearon extractos nucleares de la línea celular Hela; como control negativo (C-), se empleó una reacción en ausencia del oligonucleótido para AP-1. Como competidor no específico (carril 1), se utilizó una reacción en presencia de oligonucleótidos específicos para el factor de transcripción AP2; como competidor específico (carril 2) se usó una reacción en presencia del oligonucleótido para AP-1 no marcado. Finalmente para cada tiempo se realizó un ensayo control, con extractos de células sin estimular, crecidas a las 8 y 24 h (carriles 3 y 7).



**Figura 8 B) Cuantificación densitométrica de la translocación del factor de transcripción AP-1 inducida por la trombina a las 8 y 24 h.**

En la figura 8 B), se observa que la trombina fue capaz de inducir una activación significativa del factor de transcripción AP-1 a las 8 h (35.3 veces sobre el medio control), la cual fue inhibida totalmente en células tratadas con la hirudina (96.6%,  $p < 0.02$ ). A las 24 h, la trombina indujo una activación menor del factor de transcripción AP-1 (12 veces sobre el medio control), dicha activación fue inhibida en su totalidad por el Anti-PDGFR $\alpha$ , pero no por la hirudina (15 veces sobre el medio control).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se encontró que la trombina a una concentración de  $1 \times 10^{-10}$  M, y a las 8 h, fue capaz de inducir un aumento significativo en la proliferación celular de los fibroblastos IMR-90. Así mismo, se determinó que la trombina indujo una activación máxima de la PKC a los 5 minutos, pero que dicha activación no estaba participando en la proliferación celular inducida por esta proteasa a las 8 h. Con respecto a la actividad de las ERKs, se vio aumentada hasta 10 veces (específicamente, se observó un incremento sostenido en la activación de la ERK1). Finalmente, la trombina indujo un aumento significativo, en la translocación del factor de transcripción AP-1 a las 8 h.

### I. Proliferación celular inducida por la trombina y el PDGF en fibroblastos de pulmón humano fetal (IMR-90)

Los resultados obtenidos con el desarrollo de la presente tesis, muestran que la trombina es un factor mitogénico para fibroblastos de pulmón humano fetal (IMR-90). Estos resultados concuerdan con trabajos previos en esta línea celular y en otras de líneas de fibroblastos humanos<sup>19,20,88</sup>. Un ejemplo de lo anterior, son los trabajos realizados en la línea celular de fibroblastos de pulmón humano adulto normal (CCD 16 Lu)<sup>20</sup>, en los cuales se observa una tendencia muy semejante a la obtenida en este trabajo, sin embargo, la dosis de la trombina ( $1 \times 10^{-10}$  M) a la que se encontró una estimulación máxima ( $55.5\% \pm 0.1\%$  estimulación sobre medio control) en los fibroblastos IMR-90 (ver gráfica 1), fue menor a la concentración ( $5 \times 10^{-11}$  M) a la que se obtuvo la máxima actividad ( $44\% \pm 0.1\%$  estimulación sobre medio control) en los fibroblastos CCD 16 Lu.

Estas diferencias podrían atribuirse a que el número de receptores para la trombina varía entre una línea celular y otra, dando como resultado que una línea celular sea más sensible a la presencia de esta proteasa de serina<sup>89</sup>. Por otro lado, la línea celular IMR-90, son fibroblastos fetales, y por lo tanto son mucho más sensibles a cualquier agente mitogénico, mientras que la línea CCD 16 Lu,

En resumen, en este trabajo se encontró que la trombina induce un incremento significativo en la proliferación celular desde las primeras 8 h ( $42.12\pm 0.4$  estimulación sobre medio control,  $p < 0.05$ ), una activación máxima de la PKC ( $3.8$  pmol/min/ $\mu$ g) a los 5 min, pero dicha activación no participa directamente en la vía de señalización inducida por la trombina para ejercer su efecto mitogénico. La trombina indujo un incremento de hasta 10 veces en la actividad de las ERKs 1/2 ( $p < 0.05$ ), pero específicamente, se observó un incremento sostenido en la activación de ERK1. La translocación del factor de transcripción AP-1, fue aumentada por la trombina a las 8 h. Aunque encontramos que la actividad del PDGF fue similar a la inducida por la trombina, éste estimuló una activación de la PKC y las ERKs, ligeramente retardada en el tiempo. Estos datos sugieren, que en la línea celular IMR-90, tanto el receptor de la trombina, como el del PDGF, están acoplados a la vía de las ERKs; sin embargo, esta proteasa es capaz de inducir una vía de señalización independiente del receptor del PDGF.

siendo fibroblastos adultos, tienen una tasa de reproducción más baja y son menos sensibles a los agentes mitogénicos.

Como ya se mencionó en la sección de antecedentes, el PDGF ha sido ampliamente caracterizado como agente mitogénico para un gran número de estirpes celulares<sup>70,72,87</sup> y del que además se sabe que cada forma estructural produce diferentes efectos en la proliferación de la misma línea celular<sup>87</sup>. Para determinar la modulación inducida por este factor de crecimiento sobre la proliferación fibroblástica en esta línea celular, se realizó una curva dosis-respuesta para las diferentes formas estructurales del PDGF (ver gráfica 3), observándose que la estimulación máxima de la proliferación celular, fue inducida por la forma estructural AA a una concentración de 8 ng/ml, lo que concuerdan con lo citado en la literatura para otras líneas celulares de fibroblastos humanos<sup>70,87</sup>.

Se sabe que la trombina esta involucrada en un gran número de complejas relaciones con otros factores de crecimiento, y que el efecto biológico de esta proteasa, es el resultado neto de dichas relaciones<sup>21,80</sup>. Por ejemplo, se sabe que esta proteasa, induce la expresión y secreción del PDGF<sup>6,17</sup>; o bien que induce la liberación del TGF $\beta$ <sup>91</sup>, el FGF<sup>6,86</sup>, y la Endotelina-1 de la matriz extracelular<sup>6</sup>. Estas relaciones, apoyan la hipótesis de que esta proteasa induce su acción mitogénica, vía la liberación al medio de otros factores de crecimiento como el PDGF<sup>17</sup>.

En este trabajo encontramos dos puntos de estimulación máxima de la proliferación celular inducidos por la trombina (ver gráfica 5) a las 8 y 48 h, en ambos casos, cuantificamos la participación directa de la trombina y del receptor del PDGF a estos tiempos (ver gráfica 4 y 6 respectivamente), mediante el empleo de inhibidores específicos para el receptor de cada factor de crecimiento la hirudina y el Anti-PDGFR $\alpha$ .

Los resultados obtenidos, demostraron que la proliferación fibroblástica inducida por la trombina a las 48 h es el resultado de la participación del PDGF (ver gráfica

4), lo que concuerda con lo ya reportado<sup>70,17</sup>, en donde se comprueba que la trombina es capaz de inducir un aumento en la síntesis del PDGF-AA (a las 8 h) y su secreción al medio a las 24 h, pero su acción a tiempos menores, no se observó. En cambio, en nuestro trabajo se demostró que la trombina es responsable de la proliferación celular inducida a las 8 h (gráfica 6). Lo cual coincide con lo que se encontró en la línea celular CCD 16 Lu<sup>19,20</sup>. Por otro lado, el hecho de que en células estimuladas con la trombina, se halla encontrado un aumento en la síntesis del PDGF-AA a las 8 h<sup>17</sup>, nos muestra que antes de este tiempo, este factor de crecimiento no puede estar actuando.

## **II Intermediarios de la transducción de señal inducida por la trombina y PDGF**

El mecanismo de señalización de la trombina por medio del cual induce su poder mitogénico, no se conoce claramente, pero se ha propuesto, que esta proteasa no actúa en forma directa, sino que estimula la proliferación celular vía la activación del receptor tirosina cinasa, de otros factores de crecimiento como el PDGF<sup>18,73</sup>.

Como se mencionó anteriormente, las ERKs representan un punto clave en la transducción de señales mitogénicas inducidas tanto por la trombina (receptor tipo proteína G), como por el PDGF, (receptor tipo tirosina cinasa) y por lo tanto se ha sugerido que estas proteínas, así como la PKC y la fosfotirosina fosfatasa D, están mediando la transmodulación entre estos receptores<sup>18,76</sup>, por lo que se determinó, la actividad de la trombina y el PDGF en la activación de ambas proteínas.

En esta parte del trabajo, se estableció que la trombina y el PDGF fueron capaces de inducir un aumento en la activación de la PKC en forma dosis-dependiente y tiempo dependiente (ver gráfica 7), sin embargo el pico de actividad máxima en el caso de las células estimuladas con la trombina fue a los 5 min y para el caso de las células estimuladas con el PDGF fue a los 10 min

La activación de la PKC inducida por la trombina a los 5 min, no fue bloqueada significativamente por el Anti-PDGFR, lo que nos dice que el receptor de este factor de crecimiento no está participando en esta actividad, sin embargo, la genisteína, bloqueo totalmente dicha actividad, lo que nos permite suponer que en el proceso de señalización que activa a la PKC, está involucrada una proteína con actividad tirosina cinasa, ya sea, el receptor tipo tirosina cinasa de otro factor de crecimiento como: el EGF, (lo que resulta poco factible debido al corto tiempo en que se activa la PKC, después de que las células son estimuladas con la trombina) o alguna proteína de la familia de las Src. Se ha reportado, que estas proteínas se activan en células estimuladas con la trombina y se ha especulado que pudieran estar funcionando como acopladoras para la activación de la PKC<sup>44</sup>.

No se conoce claramente el papel de la activación de la PKC en la proliferación inducida por la trombina, sin embargo, se ha especulado que esta enzima directamente tiene la capacidad de activar a la ERK2<sup>92</sup>, en algunas líneas celulares<sup>67</sup>. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que la PKC, no participa directamente en la proliferación celular inducida por la trombina, ya que el Anti-PKC, no fue capaz de inhibir dicha actividad biológica inducida por la trombina a las 8 h (ver gráfica 11).

La activación de la PKC en nuestra línea celular, podría estar involucrada en otra actividad biológica inducida por la trombina como: el rearrreglos en el citoesqueleto y específicamente en la quimiotaxis (Fig 5). Algunas evidencias que apoyan esta idea es que se ha reportado que la actividad de la PKC $\beta$  y esta involucrada en la activación de las proteínas p38, las cuales pertenecen a la familia de las MAPK y se ha postulado que participan en la quimiotaxis inducida por la trombina en células del músculo liso<sup>62,93</sup>

Con respecto a las ERKs, se observó que la trombina es capaz de inducir una activación dosis-dependiente (ver gráfica 11), con un punto de estimulación máxima a los 10 min. Este punto de activación máxima se pudo atribuir

directamente a la actividad del receptor de la trombina mediante el empleo de la genisteína y el Anti-PDGFR (ver gráfica 12). Este comportamiento, ha sido reportado en la literatura, para otras líneas celulares como CCL39 (fibroblastos de hámster)<sup>67</sup> y HASM (células de músculo liso)<sup>46</sup>.

El PDGF también fue capaz de inducir una activación de las ERKs con un comportamiento muy semejante al inducido por la trombina, solo que el punto de estimulación máxima, se obtuvo ligeramente retardado en el tiempo (15 min, ver gráfica 12).

Por otra parte, también se determinó que la trombina activa de forma diferencial a las ERK1/2 (Figura 5), siendo la fase de activación de la p44 (ERK1) mayor y sostenida que la de la ERK2<sup>P42</sup>. Dicha fase de activación de la ERK1, ha sido ampliamente relacionada con síntesis del DNA y por lo tanto con la inducción de la proliferación celular<sup>67</sup>.

Con respecto a la activación de la ERK2<sup>P42</sup>, se ha relacionado con otras actividades biológicas de la trombina como el rearrreglo del citoesqueleto<sup>93,47</sup>, esto podría apoyar nuestros resultados, ya que como anterior a la activación de esta ERK, se observó una activación de la PKC, de la cual, se ha mencionado, su capacidad para activar directamente a la ERK2<sup>P42</sup>, esto podría explicar que ambas proteínas se estén activando en células estimuladas con la trombina, pero que la PKC, no este participando en la proliferación celular (gráfica 10).

El ligero retardamiento en el tiempo de la activación de las ERK1/2 y la PKC inducido por el PDGF, apoya nuestra hipótesis de que la vía de transducción de señal de la trombina se está activando a tiempos más cortos y sin la participación del receptor del PDGF.

### III. Aumento en la translocación del factor de transcripción AP1 inducido por la trombina

Con respecto al factor de transcripción AP-1, en la literatura existen evidencias que muestran que la trombina (en otras líneas celulares), es capaz de aumentar la tasa de unión de este factor de transcripción al DNA, hasta 21 veces sobre el medio control a las 24 h, pero dicha actividad es inhibida por la acción de la genisteína<sup>63</sup>, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que la estimulación inducida por esta proteasa a las 24 h (12 veces sobre el medio control) es inhibida por el Anti-PDGF (Figura 8 A y 8 B), lo cual indica la participación del receptor tipo tirosina cinasa del PDGF, en este aumento de la translocación de este factor de transcripción. Sin embargo, en la Figura 8 A y 8 B, pudimos determinar un aumento de la translocación del factor de transcripción AP-1, a las 8 h (35 veces sobre el medio control), el cual no es inhibido por el Anti-PDGF. Lo anterior sugiere, que la trombina podría ser capaz de inducir una vía de transducción de señal independiente, de la ya propuesta transmodulación entre su receptor (tipo proteína G y el receptor del PDGF (tipo tirosina cinasa), la cual da como resultado un aumento en la síntesis de DNA y por lo tanto, un aumento en la proliferación celular. En la literatura no se encontraron reportes a tiempos menores de 12 h, de la translocación del factor de transcripción AP-1 inducida por la trombina

Se sabe que la  $\alpha$ -trombina es capaz de inducir la proliferación celular vía su receptor acoplado a proteínas G, y que éste induce la síntesis de DNA via la activación de la PLC $\gamma$ 1 y las ERK1/2. Los resultados obtenidos en el presente trabajo ayudan a aclarar más el papel de la PKC y las ERKs, en la transducción de señal inducida por el receptor de la trombina, para ejercer su papel mitogénico a tiempos cortos, en la línea celular de fibroblastos fetales de pulmón humano (IMR-90).

Sin embargo, existen aspectos que en investigaciones subsecuentes nos permitirían descartar más claramente la transmodulación entre el receptor de trombina y el del PDGF, como la diferenciación de las formas estructurales de la PKC, que participan tanto en la vía de transducción de señal inducida por el receptor de la trombina como por el receptor del PDGF<sup>94</sup>. Así mismo se sabe que la trombina induce la activación de la PLC $\beta$ 1<sup>14</sup>, mientras que el PDGF activa a la PLC $\gamma$ <sup>23</sup>, lo anterior nos podría dar otro punto para diferenciar ambas vías de transducción de señal.

Además, debe mencionarse que todavía falta conocer un gran número de proteínas que son activadas por el receptor de trombina, y específicamente contestar preguntas como ¿todos los receptores de trombina hasta ahora identificados se activan de la misma manera y poseen la misma función?, ¿Cuál es el número de receptores que puede activar una sola molécula de trombina?, ¿El papel de la trombina en la activación del receptor solo es realizar la ruptura proteolítica de ésta?.

## CONCLUSIONES

- ✓ La  $\alpha$ -trombina indujo *in vitro* una estimulación de la proliferación celular (fibroblastos IMR-90) en forma dosis-dependiente. La dosis óptima de estimulación fue  $1 \times 10^{-10}$  M. A dicha dosis se detectaron puntos de estimulación máxima a las 8 y 48 h.
  
- ✓ Mediante el empleo del inhibidor específico de la actividad biológica de la trombina (la hirudina), un inhibidor del receptor  $\alpha$  del PDGF (Anti-PDGFR) y un inhibidor general de la actividad tirosina cinasa (la genisteína) se determinó que la estimulación de la proliferación fibroblástica, inducida por la trombina a las 8 h, era atribuible únicamente a la acción de esta proteasa; mientras que a las 48 h, dicha estimulación se debía a la acción del receptor del PDGF.
  
- ✓ La  $\alpha$ -trombina indujo una actividad de la PKC dosis y tiempo dependiente a una concentración de  $1 \times 10^{-10}$  M, con un pico de estimulación máxima a los 5 min. Con el empleo de un péptido inhibidor de la PKC y la genisteína, se determinó que en la actividad de la PKC inducida por la trombina a este tiempo, participaba una proteína tipo tirosina cinasa, pero no el receptor del PDGF.
  
- ✓ La activación de la PKC inducida por la trombina, no participa en la proliferación inducida por la trombina a las 8 h.
  
- ✓ La  $\alpha$ -trombina a una dosis de  $1 \times 10^{-10}$  M induce una actividad de las ERKs 1/2 dosis-respuesta, con un pico de estimulación máxima a los 10 min. Dicha estimulación fue de forma diferencial expresándose en mayor grado y de forma sostenida la ERK1. Mediante el empleo del Anti-PDGFR y de la genisteína, se determinó que dicha estimulación se debía a la participación directa del receptor de la trombina.

- ✓ La  $\alpha$ -trombina indujo la translocación del factor de transcripción AP-1, a las 8 h, lo cual correlaciona con el aumento en la proliferación inducida por esta proteasa.
- ✓ El receptor de la trombina y el PDGFR están acoplados a la vía de las ERKs, pero, esta proteasa es capaz de inducir una vía de señalización independiente del receptor del PDGF.

## BIBLIOGRAFIA

1. Li CQ., Vindigni A., Sadler JE., Wardell MR. Platelet glycoprotein Ib-alpha binds to thrombin anion-binding exosite II inducing allosteric changes in thrombin's activity. *J Biol Chem.* 2000;9:14-18.
2. Vacca JP. New advances in the discovery of thrombin and factor Xa inhibitors. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2000;4:394-400.
3. Cirino G. Inflammation-congulation network: are serine protease receptors the knot?. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2000;21:170-172.
4. Bar-Shavit R., Benezra M., Sabbah V., Bode W., Vlodayvsky I. Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;6(2):123-30.
5. Guo Y., Peng M. Inhibition of Thrombin-Simulated Cell Proliferation by Ceramide Is Not Through Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1997;240:405-408.
6. Cucina, A., Borrelli V. Thrombin induces production of growth factors from aortic smooth muscle cells. *Journal of Surgical Research.* 1999;82:61-66.
7. Bar-Shavit. R., Ginzburg Y., Maoz M., Vlodayvsky I. The involvement of thrombin RGD in metastasis: characterization of a cryptic adhesive site. *J Med Sci.* 1995;31(2-3):86-94.
8. Shijubo N., Uede T., Kon S., Nagata M., Abe S. Vascular endothelial growth factor osteopontin in tumor biology. *Crit Rev Oncog.* 2000;11(2):135-46.
9. Hernández-Rodríguez, N.A., Correa E., Contreras-Paredes A., Green L. La trombina, un nuevo factor útil en el diagnóstico de la metástasis pulmonar?. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología.* 1997;43(2):65-75.
10. Dabbahg, K., Chambers RC. From clot to collagen: coagulation peptides in interstitial lung disease. *Eur Respir J.* 1998;11:1002-1005.
11. Coker RK., Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur Respir J.* 1998;11:1218-1221.
12. Coughlin RS. How the protease thrombin talks to cells?. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:11023-11027.
13. Maruyana I. Biology of endotelium. *Lupus.* 1998;7(Suppl 2):S41-S43.

14. Roa G, Delafontaine P, Runge MS. Thrombin stimulates phosphorylation insulin-like growth factor 1 receptor, insulin receptor substrate-1 and phospholipase C $\gamma$ -1 in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1995; 270(46): 27871-2776.
15. Vera P. Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G-Coupled receptor activation in Human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23; 554.
16. Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SB. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*. 1991;353:674-677.
17. Ohba T. Scleroderma bronchoalveolar lavage fluid contains thrombin o mediator of human lung fibroblast proliferation via induction of platelet-derived growth factor  $\alpha$  receptor. *Am J Respir, Cell Biol*. 1994;10:405-412.
18. Daub F. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*. 1996;379:557-560.
19. Hernández-Rodríguez, NA. Tesis doctoral. 1995. Facultad de Ciencias, UNAM
20. Contreras-Paredes A. Tesis de licenciatura. 1996. Facultad de Ciencias, UNAM
21. Leof EB. Growth factor receptor signalling: location, location, location. *Trends in Cell Biology*. 2000;10:343-348.
22. Scott PH, Peacock AJ. Cell signalling in pulmonary vascular cells: do not shoot the messenger. *Thorax*. 1996;51:864-866.
23. Schenk W and Snaar-Jagalska E. Signal perception and transduction: The role of protein kinase. *Biochimical et biophysica Acta*. 1999;1449:1-24.
24. Kato J. Induction of S phase by Gi regulatory factors. *Frontiers in Bioscience*. 1999;4:787-792.
25. Lazar ME, Hegyesi T. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*. 2000;12(6):547-54.
26. DeVita V, Hellman S, Rosenberg. *Cancer: Principles and practice of oncology*. Lippincott-Raven. Publishers, Philadelphia, USA. 1997.
27. Zervolea I, Kletsas D. Autocrine regulation of proliferation and extracellular matrix homeostasis in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(2):785-90.

28. Bhat JG., Raghu G.  $\alpha$ -Thrombin inhibits interleukin-6-induced Start3 signalling and Gp 130 gene expression in primary cultures of human lung fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;256:626-630.
29. Lin Guo Y., Ming P., Williamson R. Inhibition of thrombin-stimulate cell proliferation by ceramide is not through inhibition of extracellular signal-regulated protein Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;240:405-408.
30. Preissner KT., Nawroth PP., Kanse SM. Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions. *J Pathol*. 2000;190(3):360-72.
31. Rondeau E., SraeR JD. Role of thrombin and its receptor, the protease-activated receptor 1, in the pathophysiology of glomerular injury. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 1999;29:17-34.
32. Sugden., PH. and Clerk A. Regulation of the ERK Subgroup of Kinase Cascade Through G Protein-Coupled Receptors. *Cellular Signalling*. 1997;9:337-351.
33. Raines EW. The extracellular matrix dynamically regulates smooth muscle cell responsiveness to PDGF. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 902:39-51.
34. Selbie LA., Hill SJ. G protein-coupled-receptor cross-talk: the finetuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends in Pharmacol Sciencis*. 1998;19:87-93
35. Bohm SK. Regulatory Mechanims that modulate sighalling by G-protein-coupled receptor. *Biochem J*. 1997;322:1-18.
36. Bourne HR. G-protein subunits. Who carries what message? *Nature*. 1999;337(6207):504.
37. Seifert R. GPCR- $\alpha$  fusion proteins: molecular analysis of receptor-G-protein coupling. *Trens in pharmacological Sciences*. 1999;20:383-389.
38. Fields T., Casey P. Signalling funtions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J*. 1997;321:561-571.
39. Spiegel AM.. Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocrine Reviews*. 1992;13(1):536-565.
40. Weinstein LS., Yu S., Ecelbarger CA. Variable imprinting of the heterotrimeric G protein G(s) alpha-subunit within different segments of the nephron. *Am J Renal Physiol*. 2000;278(4):F507-14.

41. López I. Signalling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol.* 1998;56(3):269-77.
42. Baass C. Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends in Cell Biology.* 1995;5:465-469.
43. Reddy EP., Korapati A., Chaturvedi P., Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene.* 2000;19(21):2532-47.
44. Newton C. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chemistry.* 1995;270:28495-98.
45. Orsini MJ., Krymskaya VP. MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. *Am. J. Physiol.* 1999. 277:L479-L488.
46. Asthon RW., Sheraga HA. Preparation and characterization of anhydrothrombin. *Biochem.* 1995;34: 6454-6463.
47. Grand R., Turnell AS., Grabham PW. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem. J.* 1996;313:353-368.
48. Chambers RC., Dabbagh K. Effect of thrombin on procollagen production and gene expression by human lung fibroblasts. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:a401.
49. Ishihara H., Connolly AJ. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature.* 1997;386:502-508.
50. Smith A. Pass the protease: new interactions between GPCRs. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2000;21:291-292.
51. Coks TM., Moffatt JD. Protease-activated receptors: sentries for inflammation?. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(3):103-8.
52. Carman CV., Benovic JL. G-protein-coupled receptor: turn-ons and turn-offs. *Current Opinion in Neurobiology.* 1998;8:335-344.
53. Tsao P., Von MZ. Downregulation of G protein-coupled receptors. *Current Opinion in Neurobiology.* 2000;10:365-369.
54. Sah VP., Seasholtz TM., Sagi SA., Brown JH. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Ann Rev Pharmacol Toxicology.* 2000;40:459-89.

55. Young DN., Hwan S. Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochem Biophys Acta*. 1995;1242: 99-108.
56. Lidington EA., Haskard DO. Induction of decay-accelerating factor by thrombin through a protease-activated receptor 1 and protein kinase C-dependent pathway protects vascular endothelial cells from complement-mediated injury. *Blood*. 2000;96(8):2784-92.
57. Fanattieri RA. Thrombin Increases cytosolic calcium and induces human airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;13:205-216.
58. Miyakawa T., Kojima M. Differential routes of  $Ca^{2+}$  influx in Swiss 3T3 fibroblasts in response to receptor stimulation. *Biochem J*. 1998;329: 107-114.
59. Katada T., Kurosu H., Okada T., Suzuki T., Hazeki O., Ui M. Synergistic activation of a family of phosphoinositide 3-kinase via G-protein coupled and tyrosine kinase-related receptors. *Chem Phys Lipids*. 1999;98(1-2):79-86.
60. Jiménez C., Portela RA., Mellado M., Rodríguez-Frade JM., Collard J., Serrano A., Martínez-AC., Avila J., Carrera AC. Role of the PI3K Regulatory Subunit in the Control of Actin Organization and Cell Migration. *J Cell Biol*. 2000;151(2):249-262.
61. Shapiro SP., Evans JN., Davis RJ., Posada JA. The seven-transmembrane spanning receptor for endothelina and thrombin cause proliferation of airway smooth muscle cells and activation of the extracellular regulated kinase and *c-jun* NH<sub>2</sub> terminal kinase groups of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1996; 271: 5750-5754.
62. Kramer RM., Roberts EF., Borsch-Haubold AG., Watson SP., Fisher MJ., Jakubowski JA. p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem*. 1996;271(44):27723-9.
63. LaMorte VJ., Kennedy ED. A requirement for Ras protein function in Thrombin-stimulated mitogenesis in astrocytoma cells. *J Biol Chem*. 1993;268:19411-415.
64. Cohen P. CAMP-depent protein kinase A. *Trens Biochem Sci*. 1994;17:408-413.
65. Jacobs-Helbert S., Wickrema A., Birrer MJ. AP1 Regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Mol Cell Biol*. 1998;18(7):3699-37007.
66. Page K., Hersshenson MB. Mitogen-activated signalling and cell cycle regulation in smooth muscle. *Frontiers in Biosciencie*. 2000:258-267.

67. Vouret-Craviari V., Obberghen-Schilling VE. Differential activation of p44 (ERK1) by thrombin and thrombin-receptor peptide agonist. *Biochem J.* 1993;289: 209-214.
68. Heldin, CH., Ostman A., Westermark B. Structure of Platelet-Derived Growth Factor implications functional properties. *Growth factor.* 1993;8;245-252.
69. Golub TR., Barker GF., Lovelt M. Fusion of Platelet-Derived Growth factor receptor b to a novel s-like gene, the, in chronic melanoma cityc leukemia with cromosomal translocation. *Cell.* 1994;77:307-316.
70. Heldin CH., Ostman A., Ronnstrand L. Signal transduction via Plateled-Derived Growth Factor receptors. *Biochimical et Biophysica Acta.* 1998;1378:F79-F113.
71. Powell DW., Mifflin RC. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol.* 1999 277:C1-C19.
72. Ostman A., Ronnstrand L. Signal transduction via Platelet-Derived Growth Factor receptors. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1998;1378:1:F79-F113.
73. Luttrell ML., Daaka Y., Lefkowitz RJ. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Current Opinion in Cell Biology.* 1999;11:177-183.
74. Schwart AM., Varon B. Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connectionsSerum-derived growth factor is thrombin?. *J Clin Invest.* 1993; 91:4.
75. Krymskaya VP., Orsini MJ., Eszterhas AJ., Brodbeck KC., Benovic JL., Panettieri RA., Penn RB. Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor activation in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(4):546-54.
76. Rivard N., McKenzie FR., Brondello JM. The phosphotyrosine phosphatase PTPID, but not PTPIC, is an essential mediator of fibroblast proliferation induced by tyrosine kinase and G protein-coupled receptors. *J Biol Chemistry.* 1995;270(18):11017-11024.
77. 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;- 518.
78. Akiyama T., Ishida., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein Kinases. *J Biol. Chem.* 1987;262(12):5592-5.

79. Chen SJ, Klann E, Gower MC, Powell CM, Sessoms JS, Sweatt JD. Studies with synthetic peptide substrates derived from the neuronal protein neurogranin reveal structural determinants of potency and selectivity for protein kinase C. *Biochemistry*. 1993; 2;32(4):1032-9.
80. Nigg EA. The substrates of the cdc2 kinase. *Semin Cell Biol*. 1991;2(4):261-265.
81. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
82. Hamaguchi A., Kim S., Izumi Y., Iwao H. Chronic activation of glomerular mitogen-activated protein kinases in Dahl salt-sensitive rats. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(1):39-46.
83. Dawes KE., Gray AJ., Laurent GJ. Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication. *Eur J Cell Biol*. 1993;61;126-130.
84. Barsega R. The biology of cell reproduction. Cambridge, MA: Harvard University Press. 1985.
85. Fenton JW, Ofofu FA, Villanueva GB, Maraganore JM. Thrombin inhibition by hirudin: how hirudin inhibits thrombin. *Homeostasis*. 1991;21;27-31
86. Benezra M. Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor heparan sulphate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood*. 1993;81; 3324-3331.
87. Bonner JC., Osornio-Vargas AR., Badger A., Brody AR: 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
88. Bar-Shavit R, Benezra M, Sabba W, Bode L, Vlodayvsky Y. Thrombin as a multifactor protein: induction of cell adhesion and proliferation *Am J Cell Respir Mol Biol*. 1992;6;123-130.
89. Coughlin SR. Molecular mechanisms of thrombin signaling. *Sem Hemathol*. 1994;31(4); 270-279.
90. Kelly J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir*. 1990;32:577-583.
91. Taipale J. Release of transforming growth factor  $\beta$ -1 from de pericellular matrix of cultured fobroblast and fibrosarcoma cell by plasmin and trombin. *J Biol Chem*. 1992;267;25378-25384.

92. Anderson GP., Anderson CL. Signal transduction by the platelet Fc receptor. *Blood*. 1990;76(6):1165-72.
93. Kanda Y, Nishio E, Kuroki Y, Mizuno K, Watanabe Y. Thrombin activates p38 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Life Sci*. 2001;16:68(17):1989-2000
94. Walker TR., Moore SM., Lawson MF., Panettieri RA., Chilvers ER. Platelet-Derived Growth Factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol Pharmacol*. 1998 Dec;54(6):1007-15.
- 95.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA