

39
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"LA TROMBINA COMO FACTOR MITOGENICO
DE FIBROBLASTOS DE PULMON HUMANO
ADULTO NORMAL."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ADRIANA CONTRERAS PAREDES



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DIRECTOR DE TESIS
DRA. NORMA A. HERNANDEZ RODRIGUEZ

1996
FACULTAD DE CIENCIAS
SERVICIO BIBLIOTECA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrin Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"LA TROMBINA COMO FACTOR MITOGENICO PARA FIBROBLASTOS DE PULMON HUMANO
ADULTO NORMAL".

realizado por CONTRERAS PAREDES ADRIANA

con número de cuenta 8820727-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Alientamente

Director de Tesis
Propietario

DRA. NORMA ALICIA HERNANDEZ RODRIGUEZ

Propietario

M. en C. SILVESTRE DE JESUS ALAVEZ ESPIDIO

Propietario

Biol. VICTOR MANUEL COFFE RAMIREZ

Suplente

DRA. MARTHA EYDI RUSE CALHORRA FUERTES

Suplente

DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

DEDICATORIA

A mis padres, por el gran apoyo, cariño y comprensión que siempre me han brindado.

A mis hermanas: Coral y Gaby por compartir mis triunfos y apoyarme en mis derrotas.

A mi abuela por el amor que me ha brindado siempre.

AGRADECIMIENTO

*A la Dra. Norma Hernández por permitirme
aprender a su lado, por su paciencia, tiempo y
dedicación.*

AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Alvaro Osornio Vargas
A la Dra. Laura Suchil Bernal*

*A la División de Investigación Clínica.
Instituto Nacional de Cancerología.*

Esta tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Cancerología
En la División de Investigación Clínica
bajo la supervisión de la Dr. Norma Hernández Rodríguez

La realización del trabajo fue financiado por:
Instituto Nacional de Cancerología (Proyecto Conacyt 4990-M9406)

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1	Ciclo celular	9
Figura 2	Cascada de la coagulación	21
Cuadro 1	Tipos de colágenas	14
Cuadro 2	Efectos de factores de crecimiento en fibroblastos	16
Cuadro 3	Efecto inducida por el inhibidor Antitrombina III	45
Cuadro 4	Efecto inducida por el inhibidor Hirudina	46
Cuadro 5	Proliferación por trombina en el tiempo	51

ABREVIATURAS EMPLEADAS

PPACK	D-Phe-Pro-Arg-CH ₂ -Cl
AT III	Antitrombina III (inhibidor de la trombina)
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
H	Hirudina
Th	Trombina
SBF	Suero bovino fetal
ITS	Insulina, transferrina y Selenio (Suplemento del medio de cultivo)
Anti-PDGF	Anticuerpo neutralizante de la actividad biológica del PDGF
ET-1	Endotelina 1
LBA	Labado bronquioalveolar
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante beta
bFGF	Factor de Crecimiento Básico para Fibroblastos
FACIT	Cólagenas fibrilares asociadas
IGF-1	Factor de Crecimiento Semejante a Insulina
iL-α	Interleucina A
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
SBF	Suero bovino fetal
DMEM	Medio de cultivo Modificado de Dulbecco

[INDICE GENERAL

RESUMEN	4
INTRODUCCION	5
CAPITULO 1	
ANTECEDENTES	
I. Actividad biológica de fibroblastos	
A) Generalidades	8
B) Proliferación celular	9
i) Ciclo Celular	9
ii) Reguladores del ciclo celular	11
C) Quimiotaxis	13
D) Colágenas	
i) Generalidades	14
ii) Tipos de colágenas	15
II. Mediadores de la actividad fibroblástica.	17
A) La α -trombina	18
i) Estructura química	19
- El receptor de trombina	19
ii) Síntesis	20
iii) Función biológica de la α - trombina	21
- Proteasa de la cascada de coagulación	22
- La α - trombina como agente mitógeno.	24
- La α -trombina como factor quimiotáctico	25
iv) Inhibidores de trombina	26
- Antitrombina III	26
- Hirudina	26
- PPACK	27
v) La α - trombina en la fibrosis pulmonar	27
B) El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF).	28
i) Estructura química	29
ii) Receptores para PDGF.	29
iii) Actividad biológica	30
iv) Mediador en cicatrización y Fibrosis	30
CAPITULO 2	
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	32

**CAPITULO 3
MATERIALES Y METODOS**

I. Cultivo celular	32
A) Cuenta celular y determinación de viabilidad	32
II. Valoración de los resultados mediante el método azul de metileno	33
A) Validación del ensayo de proliferación	33
III. Determinación de las condiciones óptimas del cultivo	33
A) Determinación de la concentración óptima de suero bovino fetal (SBF)	33
B) Determinación de la concentración óptima de trombina	35
C) Curva dosis-respuesta a trombina en presencia de Insulina, Transferrina y Selenio (ITS)	35
IV. Determinación de la contribución específica de la trombina a la proliferación fibroblástica	36
A) Determinación de la concentración óptima de los inhibidores de trombina: antitrombina II y hirudina	36
B) Efecto inducido por trombina en presencia de antitrombina III y hirudin	36
V. Validación del ensayo de proliferación celular	36
VI. Mecanismos de proliferación celular inducidos por trombina	37
A) Determinación de la concentración óptima de PDGF	37
B) Proliferación celular inducida por trombina en presencia del anti-PDGF	38
C) Optimización del tiempo de acción de la trombina en la proliferación de los fibroblastos	38
D) Contribución específica de la trombina a la proliferación fibroblástica en tiempos cortos (8 y 28 hrs)	38

CAPITULO 4

RESULTADOS	39
I. Determinación de las condiciones óptimas del cultivo	
A) Curva dosis- respuesta a SBF en fibroblastos CCD 16 Lu	39
B) Curva dosis- respuesta a trombina en el tiempo	41
C) Curva dosis- respuesta a trombina en presencia de ITS	43
II Validación del ensayo de proliferación celular	44

II Validación del ensayo de proliferación celular	46
III. Determinación de la contribución específica de la trombina a la proliferación de fibroblastos de pulmón humano adulto	
A) Determinación de la concentración óptima de los inhibidores de trombina: antitrombina II y hirudina	47
B) Efecto inducido por trombina en presencia de antitrombina III y hirudina	49
IV. Mecanismos de proliferación celular inducidos por trombina	
A) Curvas dosis respuesta a PDGF	50
B) Proliferación celular inducida por trombina en presencia del anti-PDGF	52
C) Curva dosis-respuesta a trombina en tiempos cortos	53
D) Proliferación inducida por trombina (8h) en presencia de hirudina, Anti-trombina III y Anti-PDGF	54
E) Proliferación inducida por trombina (28h) en presencia de hirudina, Anti-trombina III y Anti-PDGF	56
F) Proliferación inducida por trombina (48h) en presencia de hirudina, Anti-trombina III y Anti-PDGF	57
CAPITULO 5	
DISCUSION Y CONCLUSIONES	
I. Cuantificación de la proliferación fibroblástica	59
II. Estandarización de las condiciones óptimas del cultivo	61
III. Proliferación inducida por trombina en los fibroblastos de pulmón humano adulto	62
IV. Mecanismos de proliferación inducidos por trombina	63
Conclusiones	66
Prespectivas futuras	67
CAPITULO 6	
BIBLIOGRAFIA	68

RESUMEN

La α -trombina es un factor clave en la cascada de la coagulación, que convierte el fibrinógeno en fibrina, además se ha demostrado, su poder como agente mitogénico y quimiotáctico para Fibroblastos fetales. Sin embargo, algunos autores piensan que la proliferación inducida por la trombina es mediada por el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). Pese a que se ha demostrado su importancia en la fibrosis pulmonar, se desconoce su efecto en fibroblastos de pulmón humano adulto. El objetivo de este estudio fue determinar la acción de la trombina en la proliferación de dichos fibroblastos y determinar si su acción esta mediada o no por la acción del PDGF. Se trabajó con el método colorimétrico del azul de metileno, basado en la penetración y posterior elución de este colorante a los fibroblastos (CCD 16 Lu). La contribución específica de la trombina y el PDGF a la proliferación fibroblástica, se evaluó empleando 2 inhibidores de trombina la hirudina (Hi, 9×10^{-9} M), la Antitrombina-III (AT-III), 6×10^{-8} M y el anticuerpo específico para PDGF (Anti-PDGF, $100 \mu\text{g/ml}$). A las 48h la trombina, en una dosis de 5×10^{-11} M incrementó significativamente la proliferación de los fibroblastos ($39\% \pm 0.2\%$, $p < 0.05$). Se encontraron tres puntos de estimulación máxima de la proliferación; a las 8h ($33.7\% \pm 0.2\%$), las 28h ($23.3\% \pm 1\%$) y las 48h ($32\% \pm 1\%$). Para corroborar la contribución específica de la trombina a la proliferación de los fibroblastos a estos tiempos de incubación, también se probó la actividad de la trombina en presencia de sus inhibidores Hi y AT-III y del Anti-PDGF. La proliferación inducida por trombina a las 8h fue inhibida en un 86.3% ($p < 0.05$) por Hi y en un 86.2% por AT-III ($p < 0.05$), mientras que el Anti-PDGF no la inhibió significativamente. En contraste a las 28h, la proliferación inducida por trombina fue inhibida, en un 88.1%, y en un 86.6% por los inhibidores de trombina Hi y At-III respectivamente, mientras que el Anti-PDGF inhibió 51.7% ($p < 0.05$). Finalmente a las 48 h la proliferación inducida por trombina fue inhibida en un 97%, 86.6% y 93% por Hi, AT-III y el Anti-PDGF respectivamente. Estos resultados sugieren que la trombina incrementa por sí misma, incrementa la proliferación de los fibroblastos, a las 8h, después de este tiempo su actividad puede ser mediada por el PDGF.

INTRODUCCION

Los fibroblastos son células derivadas del mesodermo embrionario, que se encuentran ampliamente distribuidas en el tejido conjuntivo fibroso. Se sabe que participan en procesos normales de reparación como la cicatrización y que probablemente estén involucrados en el establecimiento de procesos patológicos como la fibrosis pulmonar (Mc Anault, et al.1995)

Numerosos mediadores de tipo polipeptídico, denominados factores de crecimiento o citocinas que influyen en la función fibroblástica han sido descritos (Crouch, et al.1990), cabe mencionar que en el caso de diversas lesiones pulmonares, el estudio de dichos factores, se ha documentado ampliamente (Kelley, et al. 1990, Kovacs, et al.1985). Específicamente se sabe, que algunos de estos estimulan la proliferación y la quimiotáxis de fibroblastos, tal es el caso, del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF, Seppa, et al. 1982, Osornio, et al. 1990, Bonner, et al. 1990), la endotelina-1 (ET-1 Cambrey, et al.1992), el Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina (Philips, et al.1987, Cambrey, et al. 1994), y la trombina (Gray, et al.1990, Dawes, et al. 1993, Bar-Shavit, et al. 1992).

En cuanto a esta última, motivo de estudio en la presente tesis, se sabe que, además de su participación en la cascada de la coagulación, convirtiéndose al fibrinógeno en fibrina (Fenton, et al. 1993), puede actuar como un potente agente mitogénico y quimiotáctico para fibroblastos (Bar-Shavit, et al. 1992, Dawes, et al.1993). Así mismo, se ha demostrado que esta proteasa de serina está presente en alta concentración en lavados broncoalveolares (LBA) de pacientes adultos con fibrosis pulmonar (Hernández, et al. 1995) y que es capaz de estimular la proliferación y el metabolismo de la colágena de fibroblastos fetales de pulmón humano (Hernández, et al. 1995).

Estos antecedentes destacan la importancia que pudiera tener la α -trombina, en el establecimiento de patologías pulmonares como la fibrosis pulmonar, sin embargo, a la fecha no se ha demostrado el efecto inducido por la α -trombina en fibroblastos de pulmón humano adulto normal, objeto de estudio en la presente tesis. Al respecto, algunos autores, sostienen que la acción de estimulación que induce la trombina en la proliferación de los fibroblastos fetales, puede atribuirse a la liberación de otros factores de crecimiento (Benezra, et al. 1983, 1983, Ohba, et al. 1994) como el PDGF (Shankar, et al. 1994), el Factor de Crecimiento transformante beta (TGF β), (Taipale, et al. 1992), el Factor de Crecimiento Básico para fibroblastos (bFGF), (Benezra, et al. 1983), etc. Estos pueden estar almacenados en forma latente en la matriz extracelular y ser liberados por la acción de proteasas como la α -trombina (Bar-Shavit, et al. 1990), o bien esta proteasa de serina, por sí misma, puede inducir su expresión y secreción, tal es el caso del PDGF (Ohba, et al. 1994). Cabe mencionar que, estudios preliminares desarrollados en el Instituto Nacional de Cancerología, con fibroblastos fetales, sugieren que a tiempos previos a las 24 hrs de estimulación con trombina, el efecto inducido en la proliferación fibroblástica, puede atribuirse solo a la α -trombina (Hernández, et al. 1995).

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se consideró como objetivo secundario la dilucidación del mecanismo de proliferación, inducido por la trombina, en los fibroblastos de pulmón humano adulto (CCD 16Lu). El esclarecimiento del mecanismo de acción de la trombina sobre la proliferación de fibroblastos pulmonares, cobra particular importancia, ya que estos constituyen el 40% de la población celular pulmonar (Mc Anulty, et al. 1995), y debido a los altos niveles de esta proteasa de serina encontrados en lavados broncoalveolares de pacientes con fibrosis pulmonar (Hernández, et al. 1995). Para el desarrollo del presente trabajo se consideró solamente al PDGF como posible responsable indirecto del aumento en la proliferación de los fibroblastos pulmonares inducida por la trombina.

A fin de facilitar la interpretación y el alcance de los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo, en el primer capítulo del mismo, se incluyó una sección de antecedentes, en que se revisan algunos conceptos básicos sobre la actividad biológica de los fibroblastos (estirpe celular en estudio) y su modulación inducida por diversos factores de crecimiento (la trombina y el PDGF entre otros).

Para facilitar el seguimiento de la tesis, las secciones de material y método, y la de resultados se subdividen en capítulos diferentes, incluyendo cada una de éstas desde la estandarización de las condiciones de cultivo y el efecto de la trombina en la proliferación, hasta la dilucidación de la intervención del PDGF en el mecanismo de acción de la trombina en la proliferación fibroblástica.

Los resultados experimentales obtenidos mediante el desarrollo de la presente tesis, permitieron cumplir los objetivos planteados y corroborar las hipótesis propuestas. Estos demostraron que *in vitro*, la proliferación de fibroblastos de pulmón humano adulto normal, es estimulada por la α -trombina en forma dosis-dependiente, a tiempos de estimulación previa a las 10 h, este efecto puede atribuirse exclusivamente a la trombina.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

I. Actividad biológica de fibroblastos

A) Generalidades

Los fibroblastos son células de origen mesenquimatoso, que se encuentran ampliamente distribuidas en el tejido conjuntivo fibroso; la morfología de éstos es generalmente ahusada, además tiene un citoplasma basófilo, con gran cantidad de retículo endoplásmico y varios nucleolos prominentes, lo que indica una activa síntesis proteica (Cormack, et al. 1987)

Éstas células producen diversas proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, la laminina, los proteoglicanos y diferentes tipos de colágena (I, II, III, IV, V y VI); además poseen receptores específicos, para una gran variedad de componentes de la matriz extracelular, éstos se denominan integrinas y permiten el reconocimiento de secuencias de aminoácidos que contienen arginina-glicina-ácido-aspartico, que están presentes en la mayoría de las proteínas de la matriz extracelular (Wilkie, et al. 1995). La presencia de las integrinas en la superficie celular de los fibroblastos, nos permite suponer que existen interacciones entre los fibroblastos y las proteínas de la matriz extracelular, lo que favorece la contracción de la cicatriz, y probablemente represente uno de los mecanismos importantes en la cicatrización normal, esto a su vez, puede ser relevante en el establecimiento de procesos patológicos como la fibrosis.

Los fibroblastos también sintetizan enzimas que degradan a la matriz extracelular y pueden elaborar citoquinas y enzimas de la cascada de la coagulación (Crouch, 1990).

En esta sección se trataron aspectos generales de la morfología y función biológica de los fibroblastos, a continuación se trataran con mayor detalle los parámetros biológicos que nos permiten cuantificar la función biológica de los fibroblastos como son: la proliferación, la quimiotaxis y la síntesis de colágena. Así mismo, se considerara como éstas funciones fibroblásticas, pueden ser moduladas por la trombina e intervenir en el establecimientos de procesos patológicos como la fibrosis pulmonar.

B) Proliferación celular

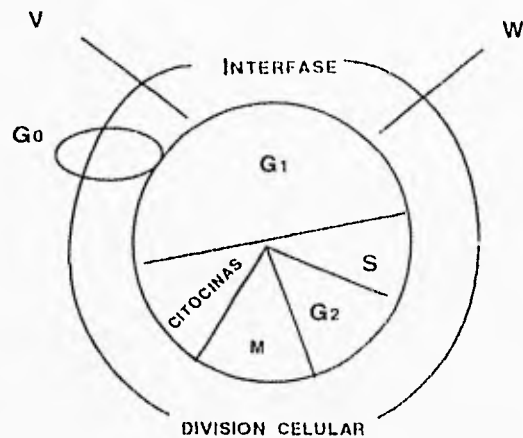
La proliferación de los fibroblastos es importante en el desarrollo del tejido normal y en la reparación del tejido dañado, también se ha demostrado que es fundamental en el establecimiento de padecimientos tales como el cáncer y la fibrosis. Aunque se sabe que los fibroblastos poseen funciones heterogéneas dependiendo de su edad, sitio de origen y especie de donde provengan (Korn, 1985).

En estudios de proliferación realizados con fibroblastos provenientes de lesiones fibróticas tempranas diversas, se ha reportado una gran heterogeneidad en sus características de crecimiento, pero se sabe que poseen un potencial proliferativo mayor que el observado en fibroblastos normales (Jordana, et al. 1988)

.i) Ciclo celular

El ciclo celular, es una serie de procesos bioquímicos y genéticos que poseen una secuencia ordenada y específica, que permite la división celular (Koshland, 1994). Para facilitar su estudio se ha dividido en cuatro fases: la fase G₁, G₂, M, S (Fig 1)

FIGURA 1. Representación esquemática del ciclo celular



La fase G₁ (gap 1) es el período anterior a la síntesis de ADN, en esta fase se eleva la síntesis de proteínas nucleares y citoplásmicas; la fase S es donde se lleva a cabo la síntesis de DNA, la fase G₂, es en la que se sintetiza el RNA y las proteínas necesarias para la mitosis; la fase M o mitótica consiste en una serie de procesos mediante los cuales el material genético se distribuye a las células hijas (Robertis, et al. 1988).

Las fases G₁, G₂ y S, constituyen la parte del ciclo celular denominada interfase, ya que durante este período las células no se están dividiendo activamente. Esto sucede en la mitosis, que es la fase más corta del ciclo celular y que en la mayoría de las células no dura más de 60 minutos. La duración de la fase S es muy constante generalmente es de 7 horas (Robertis, et al. 1988). La duración de las fases G₁ y G₂ en cambio, es muy variable y es dependiente de los tipos celulares. Para los fibroblastos especialmente estas fases duran 8 horas aproximadamente (O'Connel, et al. 1994). La fase G₀ es en la cual las células se encuentran en reposo y no participan en el ciclo celular. Las células pueden salir de esta última e iniciar el ciclo celular si reciben una señal bioquímica apropiada. Esta señal puede estar dada, por ejemplo, por factores de Crecimiento (Kelley, et al. 1990).

ii) Reguladores del ciclo celular

La proliferación celular está sometida a una modulación extrínseca por reguladores de crecimiento, entre los reguladores mitogénicos se encuentran algunos factores de crecimiento, los cuales inician una serie de eventos bioquímicos asociados con la duplicación de la masa celular y la síntesis de DNA. El mecanismo mediante el cual, dichos factores de crecimiento inducen el reinicio del ciclo celular, no está bien establecido, aunque se piensa, que éstos actúan vía receptores de membrana específicos (Collins, et al. 1993), los cuales a su vez inducen señales de transducción y fosforilación de diversas proteínas reguladoras de la función biológica (Cohen, et al. 1980)

Los factores de crecimiento pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de función biológica que ejercen en el ciclo celular, en factores de crecimiento por competencia o por progresión (Stiles, et al. 1979). Los primeros actúan en células que se encuentran en fase G_0 y las inducen a iniciar la fase G_1 del ciclo celular, un ejemplo de éstos es el PDGF. Los factores de crecimiento de progresión, como el factor de Crecimiento Semejante a Insulina (IGF-1) son necesarios para que la célula continúe el ciclo celular a través de la fase G_1 .

Aunque algunos factores de crecimiento pueden actuar como factores de competencia y de progresión, llevando a una célula desde el estado de reposo hasta la mitosis, en la mayoría de los casos se requiere de más de un factor de crecimiento, para inducir la proliferación celular máxima (Pledger, et al. 1977).

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

En la mayoría de las líneas celulares de fibroblastos, la progresión tiene una duración aproximada de 12 horas, y solo puede ser detenida en dos diferentes puntos del período G₁ (Newport, et al. 1995). El primer punto está regulado por la disponibilidad de nutrientes, es decir, que en ausencia de aminoácidos suficientes, la progresión de fase G₁ a fase S se detiene en fase G₁; a este punto de restricción en el ciclo celular, se le denomina punto V. Este punto se localiza aproximadamente a 6 horas de que inicie S. El otro punto que se puede detectar dentro del ciclo celular, es el llamado punto W, y se encuentra antes de que ocurra la síntesis de DNA (Wharton, et al. 1982).

Por otro lado, se sabe que existen sustancias diversas que inhiben el ciclo celular. Los más estudiados son las chalonas, sustancias solubles, histoespecíficas que inhiben la proliferación por mecanismos de retroalimentación, es decir, que cuando se encuentran en concentraciones altas actúan como inhibidores, mientras que a bajas concentraciones no tienen esa función (Cormarck, et al. 1987).

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

La segunda clase está constituida por los genes de respuesta temprana, que incluye a proto-oncogenes como el c-myc y el c-fos (Muller, et al. 1984). La transcripción de esta clase de genes aumenta cuando las células en reposo son estimuladas a entrar al ciclo celular y dividirse. Se sabe que los productos proteicos de los genes c-myc y el c-fos, se unen al núcleo y actúan como reguladores de la transcripción (Curran, et al. 1988). Esta clase de genes son susceptibles de regulación por factores de crecimiento, entre los que se encuentran el PDGF y el bFGF y la trombina (Bravo, et al. 1985, Rabier, et al. 1994).

La información expuesta en esta sección puede ser de gran ayuda para entender a que nivel actúan los factores de crecimiento que pueden tener un efecto modulador dentro del ciclo celular, como es el caso de la α - trombina y el PDGF, que han sido ampliamente reportados como factores mitogénicos para fibroblastos y que se emplearon para el desarrollo de esta tesis.

C) Quimiotaxis

Los fibroblastos son células capaces de migrar *in vivo e in vitro* hacia sustancias quimiotácticas a éstas. (Faller, et al. 1994). *In vitro* se han identificado numerosos agentes quimioatrayentes para fibroblastos, algunos ejemplos de éstos son la trombina (Dawes, et al. 1993), el PDGF (Osornio-Vargas, et al. 1990), el Factor Quimiotáctico para Fibroblastos Derivado de Linfocitos (LDCFF) (Postlethwaite, 1976), los tripéptidos y los dipéptidos de las colagenas tipo I, II, III (Postlethwaite, et al. 1978), y los fragmentos de la fracción V del complemento (Postlethwait, et al. 1981).

La quimiotaxis es importante en procesos normales como la iniciación y el mantenimiento de la respuesta inflamatoria y la reparación de tejidos dañados (Pierce, et al. 1991); se sabe que esta función biológica de los fibroblastos además tiene una participación importante en el establecimiento de padecimientos como la fibrosis pulmonar (Kovacs, et al. 1985). Al respecto existe una teoría que propone que el exceso de colágena y otras proteínas de matriz extracelular depositadas en el parénquima pulmonar, durante las fases tempranas de este padecimiento los fibroblastos son quimioatraídos hacia el pulmón y al aumentar su número, aumenta la fuente potencial de colágena.

En modelos experimentales de fibrosis pulmonar, se han identificado factores quimiotácticos para fibroblastos como: la fibronectina, la laminina y algunos péptidos derivados de la elastina (Crouch, 1990,). Además en pacientes con fibrosis pulmonar intersticial se ha atribuido el reclutamiento de fibroblastos a la endotelina-1 (Giald, et al. 1993), el PDGF (Martinet, et al. 1987, Osornio-Vargas, et al.1990) y la fibronectina (Kinsella, et al. 1989).

D) Colágena

i) Generalidades

Las colágenas forman una familia de proteínas de la matriz extracelular. Hasta ahora se conocen 19 tipo diferentes Estas proteínas se agrupan en estructuras supramoleculares, que interactúan a su vez con otros componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, los proteoglicanos y la laminina (Prockop, 1995).

Una de las principales funciones biológicas de los diferentes tipos de colágenas es dar fuerza e integridad al tejido conjuntivo como son: el hueso, la piel y el tendón, entre otros. Las variaciones en la estructura fisicoquímica en cada tipo de colágena están relacionadas con su función específica (Prockop, et al.1995).

Las moléculas de colágena están formadas por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas α , las cuales están formadas por las secuencias repetitivas Gly-X-Y, donde aproximadamente una tercera parte de las posiciones X-Y, están constituidas por prolina e hidroxiprolina respectivamente (Prockop, 1995). La participación de estos dos aminoácidos restringe la rotación de la estructura de triple hélice, la cual se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno. La aparición repetitiva de la glicina cada tres aminoácidos, permite la conformación de la triple hélice, ya que éste es un aminoácido pequeño, y por lo tanto, es el único que podría ocupar éste lugar (Prockop, et al. 1995).

Las moléculas de colágena miden aproximadamente 300 nm de largo y 3 nm de diámetro y están empaquetadas en fibrillas, que llegan a medir hasta 100 nm (Kivikko, et al. 1993).

ii) Tipos de colágenas

Las colágenas se agrupan para su estudio en colágenas fibrilares, no fibrilares, y colágenas fibrilares asociadas (FACIT). Esa clasificación está de acuerdo a rasgos estructurales semejantes, como son el tamaño de sus cadenas y la cantidad de regiones triple helicoidales que posee (Miller, et al.1987).

A continuación en el cuadro 1, se enlistan los principales tipos de colágenas y su distribución en el tejido humano.

CUADRO 1 Tipos de Colágenas

COLAGENAS	TIPO	DISTRIBUCION EN EL TEJIDO
F	I	Hueso, tendón, piel, tejido vascular, disco intervertebral
I		
B	II	Cartilago, disco intervertebral
R		
i	III	Tejido vascular
L		
A	V	Pulmón, piel, ojo, hueso, placenta y membranas fetales
R		
E		
S	X	Cartilago articular

F i B R I L A R E S	IV	Membrana basal, glomerular y membrana basal del cristalino.
	VI	Vasos, piel y disco intervertebral
	VII	Uniones dermoepidérmicas
	VIII	Membrana del endotelio de la cornea.
F A C I T	X	Placa del crecimiento epifiseal.
	IX	Cartilago hialino y humor vitreo
	XII	Tendón y piel de embrión, ligamento peridental.
	XIV	Tendón y piel fetal.

La información presentada en esta sección es de importancia debido a que la producción de colágena es una de las principales funciones biológicas de los fibroblastos, además se ha comprobado que la trombina, factor de crecimiento motivo de estudio de este trabajo, es un potente inductor de la producción de procolágena (Chambers, et al. 1996).

II. Mediadores de la actividad fibroblástica

En esta sección se revisarán brevemente las propiedades de algunos Factores de Crecimiento relevantes en funciones fibroblásticas. Cabe mencionar que como en el presente trabajo, se evaluará el efecto biológico inducido por la trombina en fibroblastos de pulmón humano, se hará especial énfasis en los antecedentes, hasta ahora conocidos, de este factor. Esto proporcionará el marco de referencia ideal, para el mejor entendimiento del planteamiento de las hipótesis, y al mismo tiempo facilitará la evaluación de los resultados obtenidos. Un gran número de mediadores han sido caracterizados (Cuadro 2), la mayoría son de origen polipeptídico y afectan la producción de colágena, estimulando directamente su producción, o bien, induciendo la quimiotáxis y la proliferación de fibroblastos.

CUADRO 2. EFECTOS DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN FIBROBLASTOS

MEDIADOR	EFFECTOS BIOLÓGICOS	REFERENCIA
IGF-1	+ Proliferación	Philips, et al. 1987
Interferón α	- Proliferación	Duncan y Berman, 1987
Interferón β	- Proliferación	Tominaga y Lengyel, 1985
Interferón γ	+ Proliferación	Hunninghake, et al. 1986
IL1- α y β	+ Proliferación + Síntesis de colágena	Sato, et al. 1994
Insulina	- Síntesis de colágena	Mauviel, et al. 1991
PDGF	+ Proliferación	Oliver, et al. 1989

Prostaglandina E ₁	- Síntesis de colágena	Baum, et al. 1980
Prostaglandina E ₂	- Proliferación	Oliver, et al. 1989
Acido retinoico	+ Proliferación - Síntesis de colágena	Gray, et al. 1990 Oikarinen, et al. 1987
TGF-β 1	+ Síntesis de Colágena + Degradación intracelular de colágena	Varga y Jiménez, 1987 McAnully, et al. 1981 Overall, et al. 1989
TNF-α	+ Proliferación	Mauviel, et al. 1991
EGF	-- Síntesis de colágena	Kurata y Hata, 1991
ET-1	+ Proliferación	Cambrey, et al. 1992
Aclor activador de	+ Proliferación	Wahl y Gately 1983
Corticoesteroides	- Síntesis y producción de colágena + Degradación de colágena	Cockayne, et al. 1986

+ Aumento .

- Disminución

A) La α₂-trombina

La trombina es una proteasa de serina, que es sintetizada por las células parenquimatosas del hígado (Ashton, et al. 1995, Roberts, et al. 1993)., la cual interviene en el último paso de la cascada de la coagulación y en otros procesos patológicos importantes como enfermedades inflamatorias en el pulmón y la arterioesclerosis debido a su capacidad quimiotáctica y mitogénica para un gran número de tipos celulares.

A continuación se enfatizarán algunos aspectos de la función biológica de la α -trombina, mismos que evidencian su capacidad de promover la proliferación de células mesenquimatosas y que consecuentemente, determinan su intervención en procesos fibróticos y de cicatrización.

i) Estructura química.

La α -trombina tiene un peso molecular de 37 KDa, y consta de dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro (Fenton, et al. 1993). Existen otros tipos de trombina la β y la γ éstas presentan modificaciones estructurales con respecto a la α -trombina. La β -trombina posee dos cadenas polipeptídicas de menor peso molecular, mientras que la γ -trombina posee tres cadenas polipeptídicas también de menor peso molecular, que las que constituyen a la α -trombina (Fenton, et al.1993).

La α -trombina posee un sitio activo conformado por un lugar catalítico, que posee tres aminoácidos: aspartato, serina y glicina. Además la α -trombina también posee un exosito, el cual funciona independientemente del sitio activo y está involucrado en el reconocimiento del fibrinógeno por la trombina (Fenton, 1991).

- Receptor de la α -trombina

La α -trombina es reconocida por un receptor, que posee siete dominios transmembranales acoplados al sistema de proteínas G (Vu, et al.1991). Para la activación de éste, es necesario que la α -trombina fraccione un segmento del receptor. Esto permite la exposición de una secuencia nueva de aminoácidos, muy específica, misma que genera diversas señales de transducción, algunas de éstas, son la hidrólisis del fosfoinositocido, el

incremento del Ca^{+2} citosólico, la formación de eicosanoides y la fosforilación de proteínas en residuos de serina, treonina y tirosina (Brass, et al.1994), así mismo, la trombina pone en acción la cascada de proteínas cinasas, tales como la activación de la mitosis vía la proteína cinasa (MAP), necesaria para el crecimiento de algunas células estimuladas por trombina, como se ha demostrado en la línea de megacarioblastos humanos CCL 39.

Existe evidencia experimental que sugiere que el efecto mitogénico y quimiotáctico de la trombina, requiere que el receptor celular de ésta, este ocupado via sus dos sitios activos, el de proteólisis y otro sitio de unión de alta afinidad (Coughlin, et al.1994).

Algunos estudios en los que se ha tratado de demostrar el posible mecanismo de inducción de la proliferación fibroblástica por trombina, muestran que el di-isopropilfluorofosfato de trombina (análogo de la trombina, proteolíticamente inactivo), no es capaz de estimular la proliferación de fibroblastos, sin embargo, si es capaz de competir con la α -trombina activa para unirse a receptores membranales (Bar-Shavit, et al.1986).

Al bloquear a la trombina con moléculas más grandes que el análogo antes mencionado, se ha observado una inhibición del fenómeno de competencia, hecho que sugiere que el sitio de unión de alta afinidad se encuentra muy cerca del sitio activo de la molécula de trombina (Bar-Shavit, et al.1986).

Además de los sitios activos antes mencionados, la trombina posee un exosito de unión aniónico, independientemente del sitio catalítico. Este exosito tiene la capacidad de adhesión a superficies cargadas negativamente (Fenton, et al. 1991).

ii) Síntesis

La α -trombina se sintetiza a partir de la protrombina, un zimógeno catalíticamente inactivo, que se produce en las células parenquimatosas del hígado (Ashton, et al.1995). La protrombina es una glucoproteína de cadena sencilla, que posee un enlace disulfuro

que une las regiones A y B de la molécula, cuyo peso molecular es de 72 KDa (Fenton, et al. 1993)

La conversión de la protrombina a trombina se lleva a cabo en las plaquetas, en presencia de fosfolípidos plaquetarios, Ca^{2+} , el factor Va y el factor Xa. Los fosfolípidos se unen al Ca^{2+} y a la protrombina, en la región amino terminal que contiene residuos de carboxiglutamato. El factor Va es sintetizado en el hígado por los hepatocitos, su concentración en plasma es de 10 mg/ ml; este cofactor se une a la membrana de las plaquetas y actúa como cofactor para el factor Xa, que es una proteasa de serina que corta la parte inactiva de la protrombina y libera a la trombina activa (Roberts, et al.1993)

Cabe mencionar que la trombina puede ser también activada, en la superficie de las células endoteliales, vía la acción de algunas proteínas de la cascada de la coagulación, además la trombina en su forma activa puede almacenarse en los coágulos sanguíneos (Liu, et al.1979) y en la matriz de las células endoteliales (Bar-Shavit, et al. 1989), para ser liberada durante los procesos fibrinolíticos hemostáticos; esto puede explicar que el plasma humano normal, contenga suficiente protrombina para generar 150 000 unidades de α -trombina por litro y pese a que hay un consumo del 80% de la protrombina, solo el 10% de la α -trombina potencial alguna vez es activada (Ashton, et al.1995).

iii) Función biológica de la trombina.

La α -trombina es una proteasa clave en la cascada de coagulación que actúa en la conversión de fibrinógeno a fibrina (Fenton, 1993), y que cataliza la ruptura de dos péptidos (los fibrinopéptidos A y B) (Furie, 1990), los cuales pueden producir proliferación en fibroblastos (Gray, et al. 1993).

Además de su papel hemostático se ha demostrado que la trombina estimula la proliferación de fibroblastos de pulmón humano (Gray, et al.1990), que es quimiotáctico para monocitos, macrófagos (Bar Shavit, et al.1983), neutrófilos (Bizios, et al. 1986), es capaz de activar a las plaquetas (Hartwing, et al.1995) y altera algunas funciones de las células endoteliales (Berk, et al. 1991 y Murray, et al.1995). Esta capacidad de la trombina para atraer células sanguíneas al sitio de lesión vascular, enfatiza el papel de esta proteasa en la iniciación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria y probablemente su relevancia en la patogénesis de la fibrosis pulmonar.

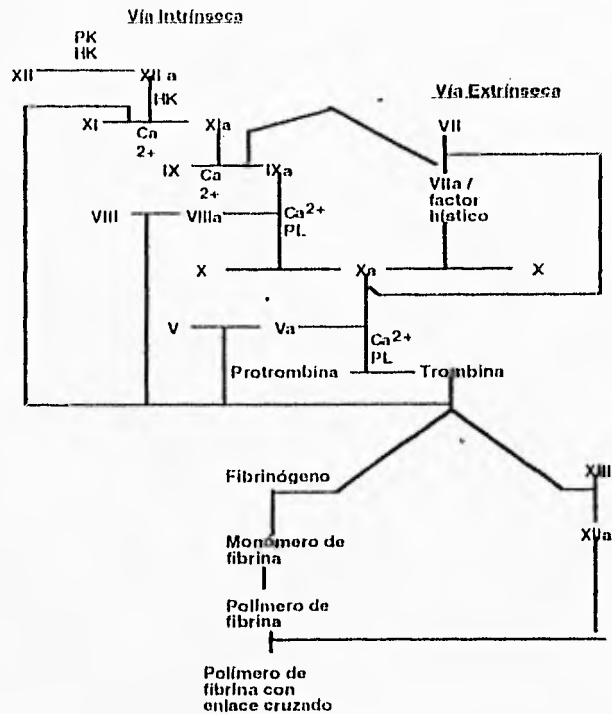
Otra función relevante de la trombina, que apoya la hipótesis de su intervención en padecimientos fibróticos en el pulmón, es su capacidad para aumentar la síntesis de procolágena en fibroblastos de pulmón humano (HLF-1) (Hernández, et al. 1995)

- Proteasa de la cascada de coagulación

La cascada de coagulación es un proceso enzimático constituido por una serie de reacciones proteolíticas, en la que en cada paso, un zimógeno es convertido a su forma activa (Roberts, et al.1993).

La principal función fisiológica de la cascada de la coagulación, es detener la hemorragia de los vasos lesionados; esta se puede activar por dos vías, la intrínseca que es el resultado de la interacción de sustancias presentes en la sangre llamados factores de la coagulación, y la extrínseca, que resulta cuando es activado un factor externo a la circulación denominado histico (factor III, Ashton, et al.1995)

FIGURA 2. Cascada de la coagulación



La α -trombina como una de las proteasas de serina que actúa dentro de este sistema de la coagulación posee como función principal hidrolizar, específicamente ésta rompe cuatro enlaces peptídicos Arg-Gli, presentes en la molécula de fibrinógeno, lo que da como resultado, la liberación del monómero de fibrina y dos fibrinopéptidos de carga negativa, el fibrinopéptido A y el B (Gray, et al.1993). Además de convertir el fibrinógeno en fibrina, la trombina también convierte el factor XIII en factor XIII activo, que es una transglutaminasa que realiza enlaces entre los monómeros de fibrina, produciendo polímeros de fibrina con enlaces cruzados, lo que le da estabilidad al coágulo sanguíneo.

Por medio de estudios de biología molecular realizados sobre el proceso de la coagulación, se han postulado nuevas funciones de la trombina (Roberts, et al.1993), entre algunas de estas se encuentra una activación de las plaquetas (Ruggon, et al.1994), así como una facilitación de la activación y el ensamblaje de los demás factores y los cofactores sobre la superficie plaquetaria (Nurdon, et al. 1994). Cabe mencionar que en ambos casos se produce un incremento en la generación del factor Xa, la α -trombina y la fibrina (Robertis, et al. 1993).

- La α -trombina como agente mitogénico.

Por otro lado, se ha demostrado que la trombina es quimiotáctica y mitogénica para los fibroblastos fetales de piel de rata y los fibroblastos de prepucio humano (Dawes, et al. 1983). También se conoce el efecto modulador de la trombina potenciando la proliferación de los fibroblastos de pulmón humano (Gray, et al.1990).

El mecanismo mediante el cual la α -trombina inicia la proliferación en fibroblastos no es conocido plenamente, sin embargo, existen evidencias experimentales que muestran que la proliferación de fibroblastos, requiere que el receptor celular para trombina este ocupado, vía sus dos sitios activos: el proteolítico y otro sitio de unión de alta afinidad (Bar-Shavit, et al.1992).

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

Se piensa que la trombina juega un papel importante en procesos normales como: la cicatrización y el remodelado vascular y en procesos patológicos como enfermedades inflamatorias del pulmón y la arterioesclerosis. Aparentemente la habilidad de la trombina como mediador de tales eventos radica, en su capacidad para promover la proliferación de fibroblastos (Cheng, et al. 1975), las células del músculo liso y los macrófagos (Bar-Shavit, et al. 1991).

Otra evidencia que apoya la hipótesis de que la trombina está involucrada en procesos patológicos como la fibrosis pulmonar, vía la inducción de la proliferación de fibroblastos, es el hecho que pueda ser generada crónicamente en el sitio de lesión, ya sea por la liberación de la enzima secuestrada en el coágulo de fibrina o bien, por la activación continua de las vías de la coagulación en presencia de un endotelio activado. Debido a la relevancia, de la trombina en el establecimiento de un proceso fibrótico, más adelante se trata ampliamente el papel de esta proteasa en la fibrosis pulmonar.

- La α trombina como factor quimiotáctico

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

Los mecanismos mediante los cuales la trombina ejecuta esta respuesta de tipo quimiotáctico, parece no ser enzimática, ya que se ha comprobado que las formas catalíticamente inactivas de la trombina, retienen su actividad quimiotáctica. Los receptores de membrana que median la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos, los monocitos y los macrófagos, no se conocen exactamente, se ha determinado que son receptores diferentes a los que median la quimioatracción inducida por los péptidos del tipo F-Met-Leu-fenil-OH (Bar-Shavit, et al. 1993).

iv. Inhibidores de la actividad biológica de la trombina

La actividad catalítica de la trombina puede ser inhibida por varias sustancias; estos inhibidores pueden ser naturales como la antitrombina III y la hirudina, o bien, sintéticos como el PPACK (D-Phe-Pro-ArgCH₂Cl, Fenton, 1993).

- Antitrombina III

La anti-trombina III (AT-III) humana tiene un peso molecular de 58 KDa. Un análisis de la estructura primaria de este inhibidor, demuestra que esta constituido por ciertos dominios como el sitio reactivo, sitios de unión potencial a la heparina, una conformación sensible a triptófano, así como algunos enlaces disulfuro S-S. La anti-trombina es capaz de neutralizar la actividad biológica de la trombina, formando con ella un complejo en relación estequiométrica 1:1, entre el sitio reactivo (arginina) y el centro activo de la trombina, serina (Rosenberg, et al. 1987).

Según experimentos realizados *in vitro*, en presencia de heparina, ésta se une a los residuos de lisina, presentes en la AT-III, induciendo una alteración alostérica de este inhibidor específico de la trombina en el residuo de arginina, que hace a la molécula más accesible a la trombina. Se sabe que la heparina aumenta la formación del complejo trombina-AT-III, hasta en 1000 veces, esto es sobresaliente, ya que existen muchos mucopolisacáridos presentes en el organismo, cuya estructura es muy parecida a la de la heparina, por lo que podría esperarse, *in vivo* un comportamiento semejante (Rosenberg, et al.1987).

Hirudina

La hirudina es un inhibidor específico y altamente selectivo para la trombina. Este se obtiene de la sanguijuela medicinal europea *Hirudo medicinalis*, sin embargo, en estudios recientes se han encontrado residuos proteicos semejantes en otras especies más populares de sanguijuela. La hirudina tiene una estructura nuclear apolar, unida por tres

puentes disulfuro, y una parte final o cola aniónica. La hirudina y la α -trombina forman un complejo no covalente con relación estequiométrica 1:1, en donde el grupo apolar de la hirudina se une a las regiones apolares cercanas al sitio catalítico de la proteasa y su exosito es ocupado por la parte final aniónica del inhibidor (Fenton, et al. 1991).

- PPACK

Se han sintetizado algunos péptidos derivados del arginil clorometil cetona que inhiben a la trombina. Estos péptidos contienen una secuencia de aminoácidos semejante a la que contienen los sitios claves de los sustratos fisiológicos de la trombina. En cuanto al mecanismo de acción de estos, se piensa que alquilan al centro activo de la trombina. Algunos ejemplos de estos péptidos son: Ile-Pro-ArgCH₂Cl, Val-Pro-ArgCH₂Cl, así como también D-Phe-Pro-ArgCH₂Cl, denominado como PPACK. El PPACK también interactúa con la trombina en una relación estequiométrica 1:1 (Kether, et al. 1979).

v) La α -trombina en la fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar es una patología con causa desconocida y cuyo desarrollo, ocasiona una insuficiencia respiratoria, que progresa hasta la muerte. La fibrosis pulmonar esta caracterizada por un incremento en la producción de proteínas de la matrix extracelular y una alteración en el número de espacios relacionados con las células del parenquima. Este aumento en la producción de matriz, se a atribuido a la activación y proliferación de fibroblastos pulmonares, probablemente debido a la participación de diferentes citocinas y mediadores inflamatorios que se ha reportado, se encuentran en el lugar de la lesión pulmonar, como la trombina (Crouch, et al. 1990).

Algunos trabajos experimentales que apoyan la idea de que la trombina es la responsable de la proliferación de los fibroblastos pulmonares en padecimientos fibróticos, son los realizados por Tani y colaboradores (1991), en los cuales se reportó una concentración significativamente alta de trombina en los lavados broncoalveolares (LBA) de ratones con fibrosis; además se demostró que dichos LBA, poseían poder mitogénico

para fibroblastos *in vitro* y que éste se podía atribuir a la trombina por lo menos parcialmente (Tani, et al. 1991).

Como ya se mencionó anteriormente, en trabajos realizados con LBA de pacientes con esclerosis sistémica, se ha demostrado un aumento en la concentración de trombina y de su capacidad para incrementar la proliferación en fibroblastos (Hernández, et al. 1995 y Ohba, et al. 1994).

Con respecto a la vía por la cual la trombina aumenta la proliferación de los fibroblastos, se han propuesto dos teorías, una que afirma que esta proteasa es la responsable directa de este aumento en la proliferación (Hernández, et al. 1995) y otra que sostiene que la trombina induce la liberación de otros factores de crecimiento, principalmente el PDGF, responsable de este aumento en la proliferación fibroblástica (Ohba, et al. 1994).

B) Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

El PDGF como ya se mencionó antes, es un mediador de la quimiotaxis y la proliferación de fibroblastos, que ha sido estudiado muy ampliamente (Heldin, et al. 1993).

Debido a que en el desarrollo del presente trabajo, se pretende determinar si el efecto mitogénico inducido por la trombina en fibroblastos adultos de pulmón humano, es mediado por el PDGF, en la siguiente sección se revizarán las principales propiedades de dicho factor de crecimiento, que permitirán comprender cabalmente los objetivos y los resultados de este trabajo.

En 1974, se caracterizó al PDGF como uno de los factores mitogénicos presente en el plasma sanguíneo. Debido a que éste es sintetizado en los gránulos α de las plaquetas, se nombró Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), sin embargo, actualmente se conocen numerosas células capaces de producirlo como los macrófagos, las células endoteliales, los trofoblastos, las células de músculo liso y esquelético, los

fibroblastos activados, células tumorales y algunas líneas celulares leucémicas (Ross, 1987). Las células que poseen receptores para PDGF y que por lo tanto constituyen células blanco de este factor de crecimiento, son las células del tejido conjuntivo, como los fibroblastos, las células vasculares del músculo liso, las células epiteliales y algunas células tumorales (Golub, et al. 1994).

i) Estructura química

La molécula del PDGF es una glucoproteína catiónica y dimerica, que consta de dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas entre sí por puentes disulfuro, estas dos cadenas poseen un 60% de homología (Heldin, et al. 1993). El PDGF tiene un peso molecular total de 30 KDa, su cadena α tiene un peso molecular de 14 KDa y la cadena β de 17 KDa (Ross, et al. 1987).

ii) Receptores para PDGF

Se conocen dos tipos de receptores para PDGF el α y el β , cada uno difiere en su afinidad por las diferentes formas estructurales del PDGF. El receptor α tiene afinidad únicamente por PDGF-AA, mientras el receptor β , interactúa con todas las formas estructurales del PDGF (Bonner, et al. 1993).

Los receptores del PDGF, poseen dominios intracelulares con actividad de tirosin cinasa, que se estimula con la unión del PDGF, y genera una compleja cascada de señales de transducción (Franke, 1995). La unión de los diferentes dímeros de PDGF con su receptor, resulta primeramente en una dimerización y autofosforilación del receptor, requisito para la asociación y activación de la fosfolipasa C- γ , el fosfatidilinositol 3 cinasa, la proteína activadora de GTPasa, el RAF-1, la activación del calcio y la activación de la proteína cinasa C (Faller, 1994). Así mismo, se activa la expresión de genes de respuesta temprana y una gran variedad de respuestas celulares atribuidas al PDGF, como la proliferación y la quimiotaxis (Franke, et al. 1995 y Heldin, et al. 1993).

iii) Actividad Biológica del PDGF

Aunque las distintas formas estructurales del PDGF están muy relacionadas entre sí, cada una de éstas induce diferentes efectos biológicos. Por ejemplo, el PDGF-BB induce un incremento en la actividad quimiotáctica de células de músculo liso, (Martinet, 1987), así como en fibroblastos, (Seppa, et al. 1982), monocitos y neutrófilos (Duel, et al.1982). El PDGF-AA, en cambio, induce en fibroblastos un aumento en la respuesta mitogénica (Heldín, 1985, Clark, et al.1989) esta variabilidad en los efectos biológicos producidos por cada uno de los dímeros del PDGF, se puede explicar por la diferencia en la cantidad de receptores expresados por cada tipo celular, y por la concentración de cada dímero, presente en el microambiente celular (Bonner, et al.1993).

vi) Papel del PDGF en la cicatrización del tejido y la fibrosis

Entre las funciones biológicas más importantes del PDGF se encuentra su participación en la cicatrización de heridas, por su poder quimiotáctico y mitogénico para diferentes tipos de células como las mesenquimatosas (Pierce, et al.1991). Otras evidencias que comprueban el papel del PDGF en la cicatrización y en la reparación de tejido es que las plaquetas, principal fuente de PDGF y los macrófagos que expresan mRNA de las dos cadenas del PDGF (Rappole, et al. 1988), son los primeros tipos celulares en llegar al sitio de lesión .

Por otro lado, existen numerosas evidencias que confirman la importante participación del PDGF en los diversos procesos fibróticos. En modelos animales se ha demostrado que los macrófagos secretan grandes cantidades de PDGF (Kovacs, 1985). Así mismo, se han observado niveles elevados de PDGF-B y del mRNA del receptor β del PDGF en el intersticio pulmonar (Fabisiak, et al.1989).

JUSTIFICACION. Se ha demostrado que la α -trombina ejerce un efecto mitogénico en fibroblastos fetales de pulmón humano (Hernández, et al.1995). En este trabajo, se busca comprobar si la trombina ejerce un efecto mitogénico en fibroblastos de pulmón

humano adultos (CCD 16 Lu), semejante al antes reportado en los fibroblastos pulmonares fetales. Como se mencionó anteriormente, existen varias propuestas que tratan de explicar si la proliferación celular inducida *in vitro*, por la trombina en fibroblastos pulmonares, se puede atribuir directamente a la acción de esta proteasa, o bien ésta es mediada, vía la liberación del PDGF. Por lo que en este trabajo se pretende también la dilucidación del mecanismo de proliferación inducido por la trombina en fibroblastos de pulmón humano adulto. El desarrollo de la presente tesis nos permitirá tener un modelo más cercano y con repercusiones a la realidad importantes en el estudio de padecimientos fibróticos en el pulmón. Debido a que se sabe que la concentración de trombina aumenta considerablemente, en LBA de pacientes con fibrosis pulmonar y considerando que a ésta se le atribuyó el aumento en la proliferación y la quimiotaxis de fibroblastos pulmonares.

CAPITULO 2

HIPOTESIS

Si la α -trombina induce una estimulación en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano fetal, entonces en fibroblastos de pulmón humano adulto, se esperaría observar un efecto cualitativamente semejante.

La estimulación de la proliferación inducida por la α -trombina en fibroblastos pulmonares se ha atribuido a la acción del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) a las 48 h. En períodos tempranos, (menores de 48h) se esperaría que la α -trombina induzca proliferación sin la participación del PDGF.

OBJETIVOS

1.- Determinar el efecto de la α -trombina en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano adulto normal a diferentes tiempos.

2.- Correlacionar la respuesta celular previamente reportada para fibroblastos de pulmón humano fetal, con la obtenida en los fibroblastos de pulmón humano adulto.

3.- Determinar la contribución específica de la α -trombina en la estimulación de la proliferación celular, mediante el empleo de inhibidores específicos de esta proteasa de serina: hirudina y anti-trombina III.

4.- Determinar la contribución específica del PDGF a la estimulación de la proliferación inducida por la α -trombina, mediante el uso del anticuerpo neutralizante de actividad biológica: anti-PDGF.

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

I. Cultivo celular

Para el desarrollo del presente trabajo, se emplearon fibroblastos de pulmón humano adulto normal CCD 16 Lu, (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Estos fueron cultivados en medio de cultivo Eagle Modificado por (DMEM, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) y mantenidos en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C. El DMEM fue suplementado con los antibióticos: penicilina-estreptomicina (10 000 U) (Sigma, ST Louis, MD, USA) y también glutamina (200 mM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), aminoácidos no esenciales (0.081 g / L) (Sigma, ST Louis, MD, USA) y vitaminas (Sigma, ST Louis, MD, USA).

A) Cuenta Celular y determinación de viabilidad

El conteo celular se realizó en una suspensión celular diluida 1:1 con el colorante vital azul tripán preparado al 0.05% con solución salina isotónica. Una fracción de esta mezcla, se colocó en la cámara de Neubauer y se contó el número de células que se encontraban en la cuadrícula empleada para el conteo de los glóbulos blancos, calculando.

$$\text{No. células/ml} = \frac{\text{No. células} \times 2 \times 15 \times 10^3}{8}$$

8

donde

- 8 : Número de cuadros contados.
- 2 : Dilución del colorante
- 15: volumen total de la dilución
- 10³: transformación de mm³ a ml.

La viabilidad celular se determinó por exclusión del colorante azul de tripán, calculando:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{No. de células teñidas}}{\text{No. células totales}} \times 100$$

II. Evaluación del efecto inducido por trombina en la proliferación celular

Como se mencionó anteriormente el principal objetivo de este trabajo, es determinar el efecto de la α -trombina en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano adulto normal a diferentes tiempos, para lo cual se usó un método colorimétrico basado en el empleo del colorante azul de metileno. Este se fundamenta en la penetración y posterior elución de dicho colorante en las células, permitiendo el conteo celular de fibroblastos cultivados en placas de 96 pozos (Oliver, 1989).

Se trabajó con fibroblastos cultivados hasta la confluencia total en las condiciones antes descritas. Estos se sembraron en placas de 96 pozos (6×10^3 células por pozo) con DMEM suplementado al 0.4% con SBF y se preincubaron durante 24 hrs, para asegurar su adhesión al sustrato y su estado en fase G_0 . Después se inició el experimento agregando 100 μ l de trombina a diferentes concentraciones (0.93×10^{-11} , 1.25×10^{-11} , 1.87×10^{-11} , 2.5×10^{-11} , 3.75×10^{-11} , 5×10^{-11} , 10×10^{-11} M), preparadas en DMEM suplementado con 0.4% de SBF y se incubó durante 48 hrs más.

Se emplearon como control del experimento fibroblastos a los que solo se les adicionó DMEM suplementado con SBF al 0.4%. mientras que como control positivo se trabajó con fibroblastos cultivados en presencia de DMEM adicionado con SBF al 10%. En cada experimento se probaron en paralelo 6 replicas de cada dilución.

Al término de este período se eliminó el medio cultivo de la placa de 96 pozos, y esta se lavó con solución amortiguadora de fosfatos. las células se fijaron agregando 100µl de solución formol- salina al 10%. Después de 30 minutos se eliminó la solución fijadora y las células se tiñeron con 100 µl del colorante azul de metileno (Sigma, ST Louis, MD,USA) preparado al 1% en una solución amortiguadora de boratos (0.01M, pH=8.5). El exceso de colorante fue removido con cuatro lavados de la placa de 96 pozos en solución amortiguadora de boratos (0.01M). La elución del colorante de las células, se llevó a cabo, mediante la adición a cada pozo de 100 µl de alcohol ácido (HCl 0.01 M) preparado en etanol absoluto (1:1 v/v).

Finalmente se midió la absorbancia del colorante eluido a 650 nm utilizando un espectrofotómetro para placas de cultivo de 96 pozos (Labsystem Multiskan MS, MCC/340). Los resultados se expresaron como el porcentaje de estimulación inducido por el factor a probar, en comparación con la estimulación observada en el medio control.

A) Validación del ensayo de proliferación

A fin de validar el ensayo de proliferación celular, en al menos tres placas de cultivo de 96 pozos de cada experimento (seleccionadas 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 previamente.

III. Determinación de las condiciones óptimas del cultivo.

A) Determinación de la concentración óptima de SBF

Debido a que la proliferación de los fibroblatos depende de la densidad celular sembrada y de las concentraciones de suero a las que se cultiven, como primer paso en el desarrollo de este trabajo, se estandarizó la concentración óptima de SBF a emplear.

Para determinar la concentración a la que se debería preincubar las células para asegurar su adhesión a la placa de cultivo, sin estimular previamente los mecanismos de proliferación, se realizó una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones de suero (0.125% a 2% en dobles diluciones). En paralelo se estandarizó el tiempo de incubación del cultivo (24, 48 y 72 h).

Todos los ensayos que se describen a continuación, se realizaron en las condiciones óptimas estandarizadas; preincubación de 24h en DMEM al 2% de SBF.

B) Determinación de la concentración óptimas de trombina

Para determinar el efecto de la trombina en la proliferación se realizó una curva dosis-respuesta de trombina a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h), adicionando diferentes concentraciones de trombina (0.935×10^{-11} , 1.25×10^{-11} , 1.87×10^{-11} , 2.5×10^{-11} , 3.75×10^{-11} , 5.1×10^{-11} , 10×10^{-11} M) a cultivos de fibroblastos en placas de 96 pozos, como se describió anteriormente. En paralelo se estandarizó el tiempo óptimo de acción de la proteasa. (24,48 y 72 h)

C) Curva dosis-respuesta a trombina en presencia de ITS

Para eliminar la presencia del suero durante el experimento, después de sembrar las células y preincubarlas 24 h con DMEM suplementado con 2% de SBF, se incuban las células 24 hrs más en presencia de un suplemento constituido por insulina, transferrina y Selenio, (ITS, Sigma, ST Louis, MD,USA), el cual le proporciona a las células los nutrientes indispensables para su crecimiento, pero elimina el ruido, que pudiera inducir la gran cantidad de factores de crecimientos presentes en el suero.

Para comprobar que este cambio no representaba modificaciones en la proliferación inducida por la trombina, se realizaron dos curvas dosis-respuesta a trombina a este tiempo, bajo las dos condiciones, es decir, con DMEM adicionado con 2% de SBF y con DMEM adicionado con ITS, en este caso, el medio control estaba constituido por fibroblastos crecidos unicamente con DMEM suplementado con ITS.

IV. Determinación de la contribución específica de la trombina a la proliferación fibroblástica.

A) Determinación de la concentración óptima de los inhibidores de trombina: la antitrombina III y la hirudina

Para cuantificar la contribución específica de la trombina a la proliferación fibroblástica, en este trabajo, se utilizaron inhibidores, como la hirudina y la antitrombina III. A fin de determinar la concentración, a la cual los inhibidores de trombina no tuvieran efecto *per se*, en la proliferación de los fibroblastos y que inhibieran la actividad biológica de la trombina, se realizó una curva dosis respuesta, en las condiciones descritas en los ensayos anteriores, en la cual se probaron diferentes concentraciones de antitrombina III (Sigma, ST Louis, MD, USA) (0.375×10^{-8} M a 12×10^{-8} M, en dobles diluciones) y de hirudina (Sigma, ST Louis, MD, USA) (0.562×10^{-9} M a 18×10^{-9} M, en dobles diluciones).

B) Efecto inducido por la trombina en presencia de hirudina y antitrombina III

Para verificar si la proliferación obtenida en presencia de la trombina, correspondía a la acción directa de esta proteasa, se realizó un ensayo donde se adicionó al cultivo mezclas, de la concentración óptima de trombina (5×10^{-11} M) y cada uno de las concentraciones óptimas de los inhibidores determinadas previamente (ver resultados).

V. Validación del ensayo de proliferación celular.

A fin de valorar 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 la ayuda de una lente con cuadrícula) el número de células/pozo. Este resultado se correlacionó con las absorbancias cuantificadas previamente.

VI. Mecanismos de proliferación celular inducidos por trombina

A) Determinación de la concentración óptima del Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF)

Existen reportes recientes en la literatura (Ohba, 1994) que sostienen que la acción de la trombina sobre la estimulación de la proliferación de los fibroblastos se produce a través de la liberación de otros factores de crecimiento como el PDGF conocido factor mitogénico y quimiotáctico para fibroblastos (Seppa, 1982, Osornio, 1990, Bonner, 1990).

Este trabajo tiene como objetivo probar que la proliferación inducida en presencia de trombina a tiempos cortos no se debe a la liberación del PDGF, sino a la acción directa de esta proteasa. Por lo anterior se estandarizó la concentración a la cual el PDGF induce una mayor proliferación para utilizarla como control en la cuantificación de la contribución específica de trombina a la proliferación.

Para conocer la concentración óptima de PDGF en la proliferación fibroblástica, se realizó el mismo procedimiento que en el caso anterior, pero ahora se trabajó con concentraciones de PDGF total y con cada una de sus diferentes formas estructurales (AA, AB y BB, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA.) (4ng/ml a 128ng/ml, dobles diluciones). Los experimentos se desarrollaron durante 48 hrs, tiempo después del cual se evaluó la proliferación celular, inducida por cada una de las diferentes formas estructurales del PDGF y el total, mediante el método azul de metileno.

B) Proliferación celular inducida por trombina en presencia de Anti-PDGF

Para comprobar si la proliferación inducida por la α -trombina se debía o no a la acción del PDGF, se realizó un experimento, donde se incubó durante 48 h, una mezcla de la dosis óptima de trombina (5×10^{-11} M) y la dosis óptima del anticuerpo neutralizante de la actividad del PDGF ($100 \mu\text{g} / \text{ml}$) (estandarizada previamente). Como control del experimento, se incubó simultáneamente una mezcla de PDGF ($32 \text{ ng} / \text{ml}$) y la dosis óptima de anti-PDGF.

C) Optimización del tiempo de acción de la trombina en la proliferación fibroblástica

Como los inhibidores específicos de la trombina, la AT-III y la hirudina tuvieron un efecto mínimo de inhibición sobre la proliferación inducida por la trombina en el ensayo realizado a las 48 h; (ver la sección de resultados). Se intentó comprobar si a tiempos más cortos, menores a 48 h (0, .2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 28 y 30) la trombina manifestaba algún efecto sobre la proliferación fibroblástica.

D) Contribución específica de la trombina a la proliferación fibroblástica en tiempos cortos

Para determinar la contribución específica de la trombina en la proliferación de los fibroblastos a tiempos cortos, se realizó el mismo ensayo de proliferación efectuado a 48 h, pero ahora a 8 y 28 h (picos máximos de acción de la trombina, ver resultados), incubando mezclas de la concentración óptima de trombina, en presencia de la dosis óptima de cada uno de sus inhibidores (AT-III y hirudina), y por otro lado la dosis óptima de trombina más la dosis óptima de anti-PDGF.

E) Análisis estadísticos

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

CAPITULO 4

RESULTADOS

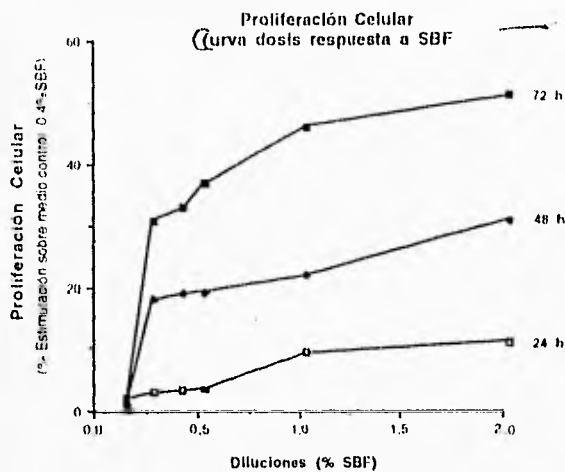
I. Determinación de las condiciones óptimas del cultivo.

Debido a que la proliferación de fibroblastos depende de la densidad celular sembrada y de la concentración de suero que se utilice para su cultivo, el primer paso en este trabajo fue estandarizar la concentración de suero que se utilizaría en el cultivo celular, ya que la densidad celular ya había sido estandarizada previamente (6×10^3 células por pozo cultivadas en 100 μ l DMEM en placas de cultivo de 96 pozos) (Hernández-Rodríguez, 1995).

A) Curva dosis respuesta a SBF en fibroblastos CCD 16 Lu

Con el fin de asegurar que la respuesta de los fibroblastos al agregar la α -fibrina, fuera independiente de la contribución que pudiera ejercer el suero contenido en el medio utilizado para su cultivo y considerando que estos fibroblastos no se pueden cultivar en ausencia total de este suplemento (resultados no mostrados). Se determinó la mínima concentración de SBF que pudiera emplearse en el desarrollo de los experimentos y la concentración óptima de SBF para lograr la adhesión celular a las placas de cultivo.

Se trabajó con dos diferentes concentraciones de SBF (0.4 y 2%) en las primeras 24 hrs del período de preincubación. En el caso de la preincubación con SBF al 0.4% los porcentajes de estimulación sobre el medio control observados fueron muy bajos (datos no mostrados), lo que indicaba una adhesión celular insuficiente.



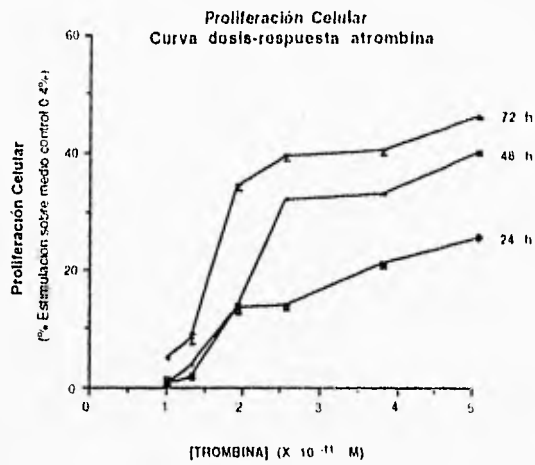
GRAFICA 1

En cambio, para la preincubación realizada con SBF al 2%, se obtuvieron absorbancias aceptables. Por lo que ésta concentración de SBF, se empleó como óptima durante el desarrollo de todos los experimentos posteriores. En cuanto al efecto del SBF en la proliferación de los fibroblastos a diferentes tiempos, como puede verse en la gráfica 1, el SBF indujo un efecto de estimulación de la proliferación celular dependiente de la dosis y del tiempo de incubación, a mayor dilución de SBF (2%) y mayor tiempo de incubación (72 hrs), se observa una mayor estimulación de la proliferación.

Como control positivo, se trabajó con SBF al 10% y se obtuvieron porcentajes de estimulación de $58\% \pm 0.5\%$, $120\% \pm 0.5\%$ y $148 \pm 1\%$ para 24, 48 y 72 hrs, respectivamente (resultados no mostrados en la gráfica).

B) Curva dosis-respuesta a la trombina a diferentes tiempos.

En las condiciones antes descritas, se incubaron diferentes concentraciones de trombina (0.935×10^{-11} , 1.25×10^{-11} , 1.87×10^{-11} , 2.5×10^{-11} , 3.75×10^{-11} , 5.1×10^{-11} , 10×10^{-11} M), preparadas en DMEM suplementado con SBF al 2%, durante 24, 48 y 72 h, para definir la concentración y el tiempo óptimo de acción de esta proteasa de serina.



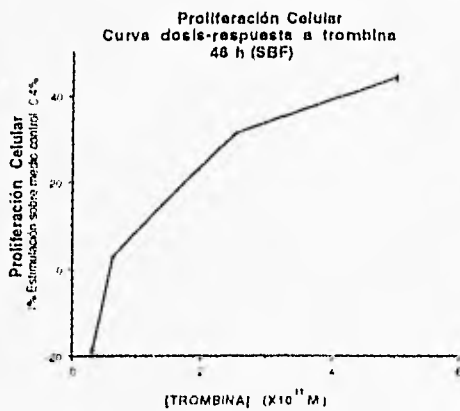
GRAFICA 2

En la gráfica 2 se muestra, que la trombina indujo un efecto dosis-dependiente con un máximo de estimulación de la proliferación fibroblástica, en cualquiera de los tres periodos de tiempo probados ($24.6 \% \pm 0.2\%$ para 24 h, $39 \% \pm 0.2\%$ para 48 h y $45 \% \pm 0.1\%$ para 72 h) a una concentración de 5×10^{-11} M. Sin embargo, en la curva de 24 h se observaron valores de estimulación relativamente bajos. Por otro lado, considerando que a las 72 h podrían empezar a generarse "in situ" otros factores de crecimiento, que intervinieran en el sistema y que enmascararían por tanto, el efecto de la trombina (Baserga, et al. 1985), se seleccionó el tiempo de 48 h. como tiempo óptimo para el desarrollo de experimentos posteriores.

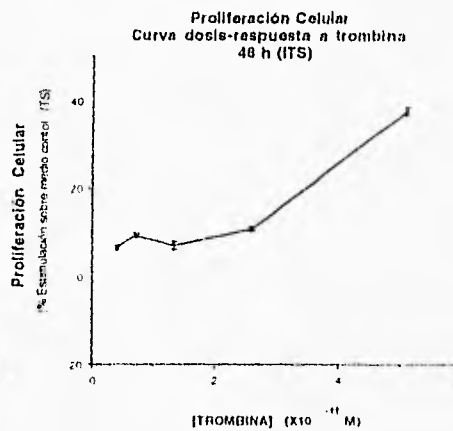
En paralelo se trabajó con SBF al 10% como control positivo, los porcentajes de estimulación observados en este caso fueron $60\% \pm 1\%$, $98\% \pm 1\%$ y $150\% \pm 1\%$, para las 24, 48 y 72 h respectivamente (datos no mostrados en la gráfica).

C) Curva dosis-respuesta a trombina en presencia de ITS

Para eliminar la posible participación de factores de crecimiento presentes en la baja concentración de suero utilizada (2%), en la proliferación del cultivo, se probó trabajar con medio DMEM enriquecido con un suplemento compuesto de insulina, transferrina y selenio (ITS). En paralelo se utilizó medio de cultivo suplementado con SBF, a fin de comparar los resultados obtenidos, y verificar si había diferencia significativa entre ambos grupos de resultados.



GRAFICA3



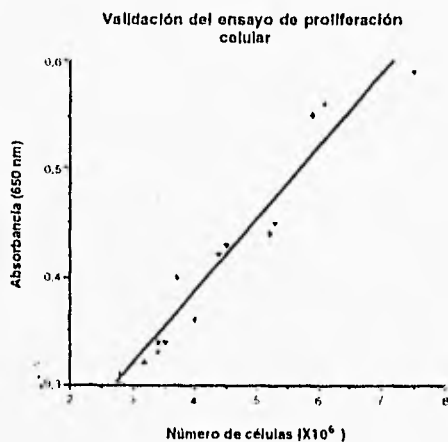
GRAFICA 4

Como se puede observar en las gráficas 3 y 4 en ambas condiciones de cultivo, es decir, en presencia de SBF o ITS, la trombina indujo una estimulación de la proliferación celular de los fibroblastos CCD 16 Lu en forma dosis dependiente, después de 48 h de cultivo, no se observó una diferencia significativa en la estimulación inducida por trombina entre ambos experimentos. El punto estimulación máxima para la curva dosis-respuesta a trombina con ITS fue de $36.55\% \pm 0.5\%$ mientras que para la realizada en presencia de SBF fue de $44\% \pm 0.1\%$. Considerando estos resultados, los siguientes experimentos se llevaron a cabo en medio DMEM suplementado con ITS.

El control positivo (SBF 10%) en estos casos, indujo una estimulación de la proliferación fibroblástica de $97\% \pm 1\%$ y $99\% \pm 1\%$, para la curva de SBF e ITS respectivamente (resultados no mostrados en la gráfica).

II. Validación del ensayo de proliferación

La gráfica 5 muestra un ejemplo de validación realizado en los experimentos principales.



GRAFICA 5

La correlación obtenida presentó un coeficiente de correlación de 0.94 con $p < 0.05$, lo que resulta muy alto y válida perfectamente el método indirecto utilizado para obtener los resultados en este trabajo.

III. Determinación de la contribución específica de la trombina a la proliferación de fibroblastos de pulmón humano adulto.

A fin de determinar la contribución específica de la trombina, al incremento en la proliferación de los fibroblastos de pulmón humano (CCD 16 Lu), se trabajó con dos inhibidores específicos de la trombina, la hirudina y la anti-trombina III. Primeramente se estableció el efecto que cada uno de éstos, tenía en la proliferación celular por si solo. Posteriormente, se estableció la dosis óptima de inhibición de cada uno de estos, con trombina en dosis de estimulación subóptima (3.75×10^{-11} M), para asegurar que el inhibidor bloqueara plenamente la acción biológica (proliferación) de esta proteasa de serina.

A) Determinación de la concentración óptima de los inhibidores de trombina

Se trabajó con un amplio intervalo de concentraciones de hirudina (0.562×10^{-9} a 18×10^{-9} M) y de anti-trombina III (0.375×10^{-8} a 12×10^{-8} M), mismas que se adicionaron a la monocapa de fibroblastos mantenidos en las condiciones antes descritas, (placas de 96 pozos, DMEM-F12 + ITS, 5% CO_2 , etc).

CUADRO 3 Efecto del inhibidor Antitrombina III

Antitrombina III (M)	% Estimulación sobre medio control	EEM
0.375 x10 ⁻⁸	48.2	1.0
0.75 x10 ⁻⁸	9.5	1,0
1.5 x10 ⁻⁸	7.0	2.0
3 x10 ⁻⁸	7.6	1.0
6 x10 ⁻⁸	0.0	1.0
12 x10 ⁻⁸	-29	0.5

Como se observa en el cuadro 3, la AT-III indujo efectos diversos en la proliferación de los fibroblastos CCD 16 Lu, a dosis entre 0.375x10⁻⁸ y 3 x10⁻⁸ M estimuló la proliferación (48.2% ±1%, 9.5% ± 1% , 7.0% ± 2% y 7.6 ± 1% respectivamente), mientras que a la dosis de 12 x 10⁻⁸ M, aparentemente no sólo inhibió la proliferación, sino que fue tóxica (-29% ± 0.5%). La única dosis donde la AT-III no afectó la proliferación fue 6 x 10⁻⁸ M.

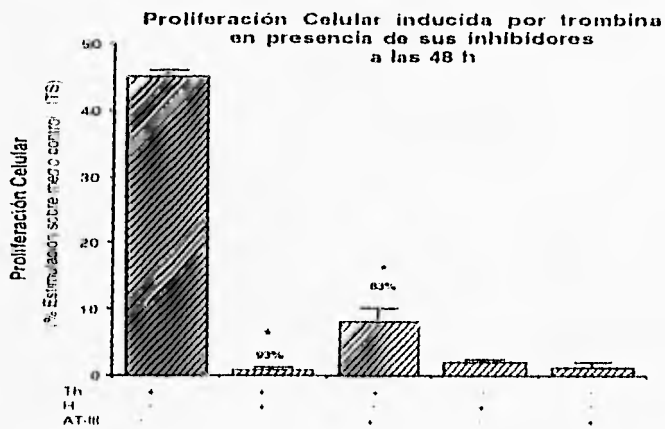
CUADRO 4 Efecto del inhibidor hirudina

Hirudina (M)	% estimulación sobre medio control	EEM
0.562 x10 ⁻⁹	7.5	1.0
1.11 x10 ⁻⁹	3.9	0.7
2.25 x10 ⁻⁹	3.8	.0.5
4.5 x10 ⁻⁹	10.6	2.0
9 x10 ⁻⁹	0.0	1.0
18 x10 ⁻⁹	-8.4	1.0

En el cuadro 4 puede verse que el efecto de la hirudina en la proliferación fibroblástica, en dosis de 0.562×10^{-9} , 4.5×10^{-9} fue de estimulación, mientras que a la dosis de 18×10^{-9} M fue de inhibición de la proliferación. Solamente la dosis de 9×10^{-9} no indujo ningún cambio significativo en la proliferación de fibroblastos con respecto al medio control. En los experimentos subsecuentes, se trabajó con estas dosis de AT-III (6×10^{-9} M) y hirudina (9×10^{-9} M) respectivamente como óptimas.

B) Efecto de la α -trombina inducido en proliferación, en presencia de sus inhibidores

Aunque es bien conocido que los inhibidores de la trombina, interactúan con ésta en una relación estequiométrica 1:1, las dosis de AT-III y hirudina, seleccionadas como óptimas representan más del doble de la concentración óptima de trombina (5×10^{-11} M), lo que asegura en un 100% la inhibición del efecto de la α -trombina. En este experimento de proliferación celular, se probó la dosis óptima de trombina en presencia de las dosis óptimas de hirudina y AT-III, a fin de corroborar la inhibición.



GRAFICA 6

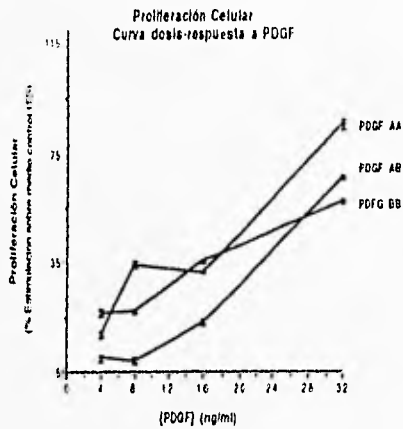
Como puede verse en la gráfica 6, la AT-III indujo una inhibición significativa hasta del 83%, ($p < 0.05$) de la estimulación de la proliferación inducida por trombina ($45\% \pm 0.9\%$, $p < 0.05$). Un efecto semejante se observó en presencia de la hirudina, quien inhibió en un 93.0% la proliferación inducida por trombina a las 48 h..

Como control se trabajó en paralelo con AT-III y hirudina solas. Se corroboró que éstos *per se* no estimularon la proliferación fibroblástica significativamente ($1\% \pm 0.5\%$ y $2\% \pm 0.7\%$ respectivamente).

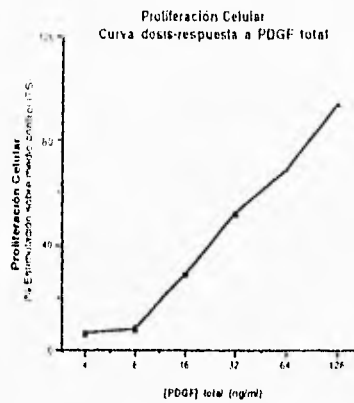
IV. Mecanismos de proliferación celular inducido por la trombina

A) Curva dosis-respuesta al PDGF

Como uno de los objetivos del presente trabajo, plantea dilucidar el mecanismo de acción de la trombina para inducir el incremento en la estimulación de la proliferación fibroblástica, es decir, determinar si la trombina actúa por sí misma, o bien vía la acción del PDGF, primeramente se realizó un ensayo de proliferación, bajo las condiciones descritas, donde se determinó el efecto inducido por este factor de crecimiento a la proliferación de los fibroblastos de pulmón humano adulto (CCD 16 Lu). Se adicionó diluciones de las tres diferentes formas estructurales del PDGF (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-BB) (4 a 64 ng/ml. en dobles diluciones).



GRAFICA 7



GRAFICA 8

La gráfica 7 muestra, el efecto inducido en la proliferación de fibroblastos CCD 16 Lu por las tres formas estructurales del PDGF. Cada una de estas indujo un efecto dosis dependiente, aunque el PADGF-BB estimuló menos la proliferación celular, observándose una estimulación máxima de $57.2\% \pm 0.7\%$ a una concentración de 32 ng/ml. El control positivo (SBF al 10%) indujo una estimulación de la proliferación sobre el medio control de $117\% \pm 0.9\%$, $130\% \pm 0.7\%$, $138\% \pm 1\%$, para PDGF-BB, PDGF-AB y PDGF-AA respectivamente.

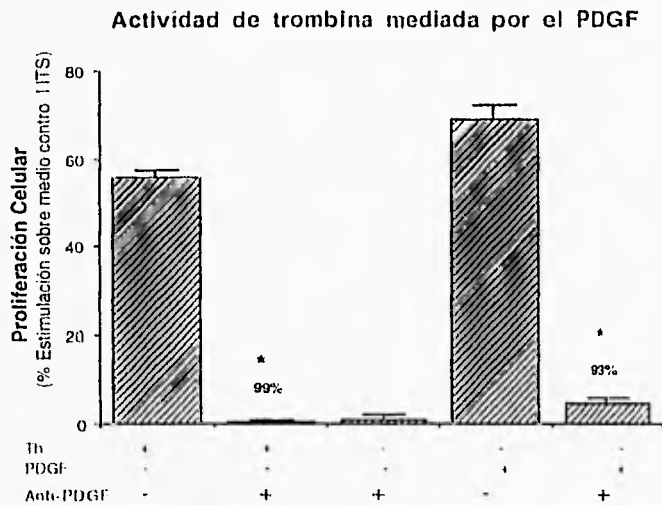
Las formas estructurales AA y AB mostraron un comportamiento muy semejante, observándose puntos de estimulación máxima de $85.2\% \pm 0.6\%$ y $66\% \pm 0.7\%$ para PDGF-AA y PDGF-AB respectivamente a una dosis de 32 ng/ml.

Por otra parte, se repitió el experimento antes planteado, pero ahora empleando diluciones de PDGF humano total.

Como puede verse en la gráfica 8 el PDGF total incremento la proliferación fibroblástica en forma dosis dependiente, observándose un máximo de estimulación de 85.9% \pm 2%) con respecto al medio control, a la dosis de 128 ng/ ml. El control positivo (SBF al 10%) indujo una estimulación de la proliferación sobre el medio control de 164% \pm 2%.

Debido a que la mayor estimulación de la proliferación fibroblástica inducida por las diferentes formas estructurales del PDGF, se observó con PDGF AA, a la concentración de 32 ng/ml, este se uso como control adicional para los siguientes experimentos

B) Proliferación celular inducida por trombina en presencia de Anti-PDGF



GRAFICA 9

En la gráfica 9 se observa que después de 48 hrs de cultivo la trombina (5×10^{-11} M), indujo una estimulación de la proliferación fibroblástica del 58 % \pm 0.3%, dicha proliferación fue bloqueada significativamente ($p < 0.05$) hasta en un 99% al incubar la trombina en presencia de anti-PDGF (100 μ g/ml). Como control del experimento se trabajo simultáneamente con PDGF-AA (32 ng/ml, concentración estandarizada previamente), anti-

PDGF solo y su combinación. El PDGF indujo una estimulación de la proliferación del 69%± 1% misma que fue inhibida significativamente ($p<0.05$) hasta un 93% con el anticuerpo anti-PDGF. Este último a la concentración empleada, no indujo ningún cambio significativo en la proliferación fibroblástica ($0.9 \pm 0,5\%$).

C) Curva dosis-respuesta a trombina en tiempos cortos

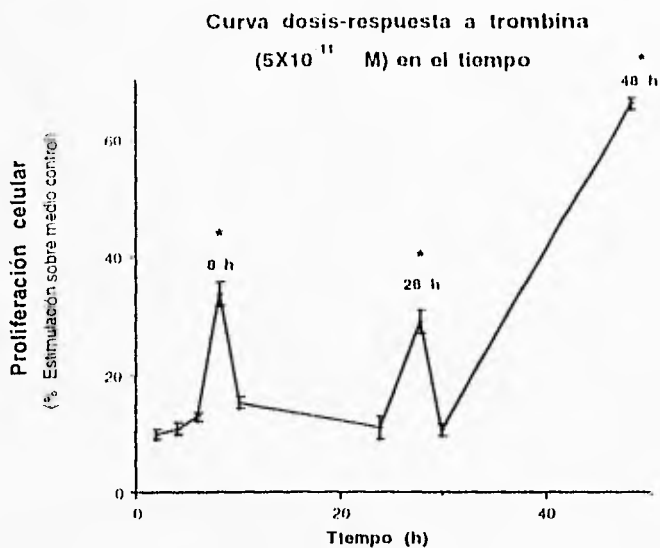
Una vez comprobado que el efecto de la proliferación fibroblástica inducido por la trombina, era inhibido totalmente por anti-PDGF a las 48 h, se intentó corroborar el efecto ejercido por esta proteasa de serina, pero ahora a tiempos más cortos. Se realizó una cinética de proliferación a tiempos diferentes (0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 28, 30 y 48 h) en presencia de trombina.

CUADRO 5 Proliferación inducida por trombina en el tiempo

[Trombina] ($\times 10^{-11}M$)	2 h	4h	6h	8hr	10 h	24 h	28 h	30 h	48 h
0.935	8.6%	1.6%	9.4%	9.4%	2%	2%	15%	2%	47.3%
1.25	-1.9%	14%	14.7%	14.7%	1%	1%	11.9%	2%	43.1%
1.87	6%	12.2%	12.5%	12.5%	1%	1%	11.3%	3%	48.3%
2.5	9.6%	11.5%	14.7%	14.7%	3.8%	3.8%	26.8%	5%	65.6%
3.75	7.3%	11.8%	18.3%	18.5%	6.4%	6.4%	27.7%	6%	63%
5	9.9%	14.7%	12.8%	33.7%	15.1%	11.2%	29.8%	15%	66%
10	5.7%	8.9%	31%	31%	10%	10%	28%	11.9%	44%

Como se observa en el cuadro 5, independientemente de la concentración usada, se observó un efecto dosis respuesta a trombina muy semejante. Destacan dos puntos de estimulación en la proliferación fibroblástica inducida por la dosis óptima de trombina $5 \times 10^{-11}M$ para 8 y 28 hrs con valores de $33.7\% \pm 2\%$ y $29.8\% \pm 2\%$ respectivamente.

Los valores de proliferación obtenidos para el control positivo en los tiempos de 8, 28, y 48 h fueron $90\% \pm 2\%$, $89\% \pm 2\%$ y $102\% \pm 3$, respectivamente.

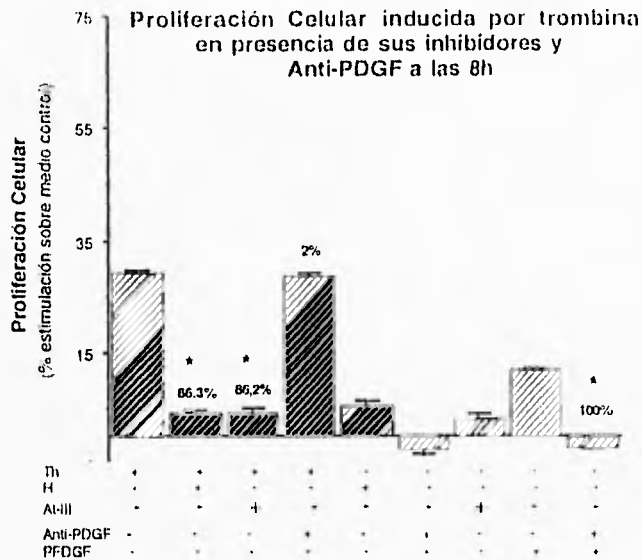


GRAFICA 10

En la gráfica 10 se observa que a la concentración óptima de trombina (5×10^{-11} M) destacan dos puntos de estimulación máxima en la proliferación fibroblástica, (adicional al de 48 hrs al que ya se había trabajado) $33.7 \pm 1\%$ y $29.8 \pm 2\%$, a las 8 y 28 hrs respectivamente. Dicha estimulación en la proliferación fue significativa ($p < 0.05$) con respecto a lo observado en el medio control.

D) Proliferación inducida por trombina (8h) en presencia de hirudina, anti-trombina III y Anti-PDGF.

Para poder observar, si el punto de estimulación de la proliferación encontrado a las 8 y a las 28 h se debía a la acción directa de la trombina, se realizaron dos ensayos de proliferación como los descritos para la gráfica 9 a 48 h, pero ahora incubando 8 y 28 h respectivamente.

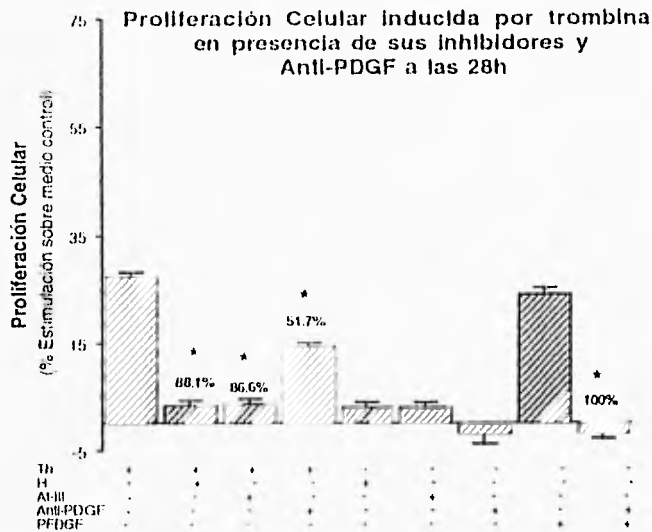


GRAFICA 11

Como puede observarse en la gráfica 11 la proliferación inducida por la trombina a las 8 h ($29.0\% \pm 0.3\%$), fue inhibida significativamente ($p < 0.05$) hasta en un 86.3% por hirudina y en un 86.2% por AT-III, mientras que con el anticuerpo neutralizante de la actividad biológica del PDGF, el anti-PDGF, no se inhibió significativamente la acción de esta proteasa ($2\% \pm 0.4\%$).

El PFDG-AA (32 ng/ml) estimuló la proliferación de los fibroblastos en un $13\% \pm 0.4\%$ en 8 h y dicha estimulación fue inhibida significativamente ($p < 0.05$) hasta en un 100% por el Anti-PDGF (100 ng/ml). Este anticuerpo no indujo cambio alguno en la proliferación fibroblástica ($-2\% \pm 1\%$). Tampoco los inhibidores de trombina hirudina y AT-III, a las dosis probadas indujeron un efecto significativo en la proliferación de los fibroblastos CCD 16Lu ($5\% \pm 1\%$ y $2\% \pm 1\%$ respectivamente).

E) Proliferación inducida por trombina (28 h) en presencia de hirudina, anti-trombina III y Anti-PDGF.

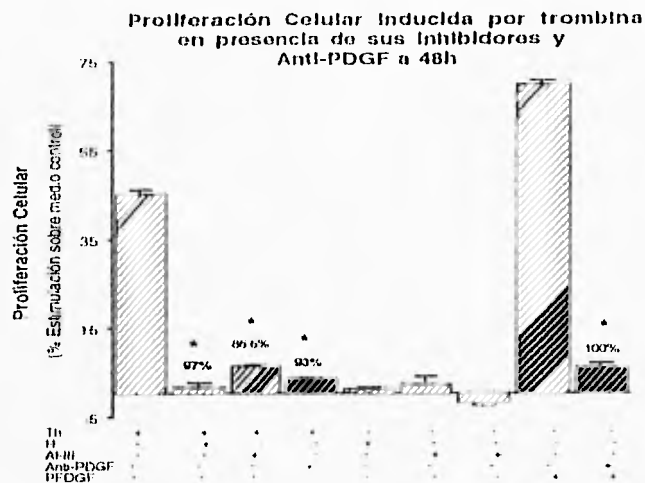


GRAFICA 12

En la gráfica 12, se observan los resultados del ensayo semejante al antes presentado, pero realizado a las 28 de incubación, (otro de los puntos de estimulación máxima en la proliferación fibroblástica inducida por trombina). La trombina indujo una estimulación del $27\% \pm 1\%$, después de 28 h. Esta estimulación fue inhibida significativamente ($p < 0.05$) por hirudina, AT-III y Anti-PDGF con valores de inhibición del 88.1%, 86.6%, 51.2% respectivamente.

El PDGF-AA (32 ng/ml) estimuló la proliferación de los fibroblastos en un $23.9\% \pm 1\%$ en 28 h y dicha estimulación fue inhibida significativamente ($p < 0.05$) hasta en un 100% por el Anti-PDGF (100 ng/ml). Los inhibidores de trombina hirudina, AT-III y el inhibidor de PDGF (Anti-PDGF), *per se*, a las dosis probadas no indujeron efecto significativo en la proliferación fibroblástica ($2\% \pm 0.8\%$, $2.0\% \pm 1\%$ y $-2\% \pm 1\%$, respectivamente).

F) Proliferación inducida por trombina (48 h) en presencia de hirudina, anti-trombina III y Anti-PDGF.



GRAFICA 13

En la gráfica 13, se observan los resultados del ensayo realizado a las 48 h de incubación, a este tiempo, la trombina indujo una estimulación del $45\% \pm 0.9\%$. Esta estimulación fue inhibida significativamente ($p < 0.05$) por hirudina, AT-III y Anti-PDGF con valores de inhibición del $97 \pm 0.5\%$, $86.6\% \pm 0.6\%$, $93\% \pm 0.6\%$ respectivamente.

El PDFG-AA (32 ng/ml) estimuló la proliferación de los fibroblastos en un $69.9\% \pm 1\%$ en 48 h y dicha estimulación fue inhibida significativamente ($p < 0.05$) hasta en un 100% por el Anti-PDGF (100 ng/ml). Los inhibidores de trombina y el PDGF, *per se*, a las dosis probadas no indujeron ningún efecto significativo en la proliferación fibroblástica ($1.3\% \pm 0.7\%$, $3\% \pm 0.4\%$, y $-2\% \pm 0.5\%$, para hirudina, AT-III y anti-PDGF respectivamente).

Los resultados observados en esta gráfica se habían presentado anteriormente por separado en las gráficas 6 y 9, por lo que se puede observar es que el comportamiento es reproducible.

CAPITULO 5

Discusión

Con el desarrollo del presente trabajo se determinó el efecto de la α -trombina en la proliferación de fibroblastos de pulmón humano adulto (CCD 16 Lu). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en fibroblastos de pulmón humano fetal (IMR-90, Hernández, 1995), encontrando que la trombina induce un aumento significativo en la proliferación celular de los fibroblastos de pulmón humano adulto normal, con un comportamiento dosis-respuesta, y con un punto de estimulación de la proliferación celular máximo a la concentración de $5 \times 10^{-11} \text{M}$. El comportamiento de los fibroblastos de pulmón humano fetal, fue semejante, solo que en este caso la estimulación máxima se encontró a la dosis de $1 \times 10^{-10} \text{M}$.

Otro objetivo de esta tesis fue dilucidar el mecanismo de acción de la trombina para estimular la proliferación fibroblástica. En la literatura se ha reportado al PDGF como el factor de crecimiento responsable de la proliferación celular inducida por la trombina en fibroblastos. Sin embargo, con el desarrollo de este trabajo, se demostró que la trombina posee tres picos de estimulación máxima a diferentes tiempos (8, 28 y 48 h), encontrando que a 8 h, la trombina induce *per se*, a proliferación celular en los fibroblastos CCD 16 Lu, mientras que a las 28 h, se demostró una contribución significativa del PDGF al aumento en la proliferación y finalmente a las 48 h, como ya se había reportado en la literatura, se determinó que el responsable de la proliferación celular inducida en los fibroblastos era el PDGF.

I. Cuantificación de la proliferación fibroblástica

Una de las mayores ventajas que ofrecen los experimentos realizados en cultivos celulares, como los empleados en el desarrollo de la presente tesis, es que brindan información sobre el comportamiento de poblaciones puras y además permiten la caracterización de mediadores que modulan diversas actividades biológicas. En este caso específico se estudió la modulación fibroblástica inducida a nivel de la proliferación celular, por la α -trombina.

El método colorimétrico, basado en el uso del colorante azul de metileno, que se emplea para la evaluación de la proliferación fibroblástica, durante el desarrollo del presente trabajo, es un sistema *in vitro*, que permite determinar el efecto de factores de crecimiento puros o presentes en fluidos biológicos, en la proliferación de dichas células (Oliver, 1989). Una de las ventajas del sistema, es que permite observar directamente el efecto del factor de prueba en las células. Los ensayos convencionales utilizados para la determinación de la proliferación celular, se basan en el uso de isótopos radioactivos y evalúan la incorporación de timidina tritiada, sin embargo, éstos asumen que la cantidad de precursor radioactivo adicionado al cultivo celular en división será empleado en su totalidad, además son largos y llevan implícito el riesgo del trabajo con material radioactivo. En cambio el método del azul de metileno, es rápido, evita el uso de material radioactivo y permite la confirmación de los resultados por cuenta directa (Oliver, 1989). Cabe mencionar que en este estudio en particular, se estandarizaron las condiciones de trabajo (bajas concentraciones de suero, y el empleo de un sustituto del suero: ITS) de tal manera que la evaluación de la proliferación fibroblástica pudiera ser atribuida exclusivamente al factor de crecimiento a prueba (la α -trombina), descartando la contribución del suero presente en el medio de cultivo ya que fue imposible trabajar en ausencia del mismo.

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

observaciones realizadas. Cabe mencionar sin embargo, que en un intento por disminuir estas limitantes, se controló el número de pasaje celular en el que se desarrollaron los experimentos y se empleó una concentración de anticuerpo anti-PDGF, que no saturara el sistema. Así mismo debe mencionarse que el sistema de prueba es válido (ver gráfica 5) mediante la correlación de la cuenta directa de algunos pozos de las placas de los experimentos más importantes del trabajo, con las absorbancias previamente obtenidas a 650 nm, para estos mismos pozos (Gray, 1991, Oliver, 1989). Como se puede observar en la gráfica se obtuvo una buena correlación ($r=0.94$).

II. Estandarización de las condiciones óptimas del cultivo

Los fibroblastos de pulmón humano adulto normal (CCD 16 Lu) empleados para el desarrollo del presente trabajo, deben ser crecidos en DMEM-F12 al 10% de SBF. Estos como se puede observar en la gráfica 1, fueron sembrados con una densidad de 6×10^3 células/pozo como se reporta en la literatura para otras líneas de fibroblastos (Hernández, 1995). Los resultados de este trabajo, demostraron que se requería suplementar al medio DMEM-F12 con 2% de SBF, como concentración mínima para la preincubación de 24hrs; y asegurar de esta forma su adhesión a la placa de cultivo, su estado en fase G_0 y al mismo tiempo evitar una estimulación en la proliferación celular, que enmascararía el efecto inducido por el factor de crecimiento a probar, la α -trombina, ya que como lo muestra la gráfica 1, la proliferación inducida después de 48 y 72 hrs de incubación es muy alta.

En un principio se intentó realizar la siembra a una concentración de SBF de 0.4%, reportada como óptima para trabajar con fibroblastos de pulmón humano fetal (Hernández, 1995, Dawes, 1993, Gray, 1991, Cambrey, 1992), sin embargo, a esta concentración, los fibroblastos de pulmón humano adulto normal (CCD 16 Lu), no se adherían a la placa de cultivo, por lo que se tuvo que aumentar la concentración del SBF al 2% para la siembra de las células.

Debido a que esta línea celular es incapaz de crecer sin suero, para eliminar la presencia del suero, una vez que las células se adherían a la placa, se dejaron incubar 24 hrs más con DMEM suplementado con ITS, que es un sustituto del suero, que provee a las células de los nutrientes mínimos para crecer, pero evita la presencia de los múltiples factores de crecimiento que están en el suero. La incubación con este sustituto nos asegura que las células no entrarán en contacto con otros factores de crecimiento, diferentes a la trombina que enmascararían el efecto de esta proteasa de serina, durante los experimentos. Mediante la repetición de experimento mostrados en la gráfica 3, pero ahora en presencia de ITS (gráfica 4) pudimos determinar que la proliferación inducida por la trombina en el sistema, no se ve afectada si se incluye en los experimentos la presencia de este sustituto del suero. En resumen, en este trabajo se demostró que esta línea celular de fibroblastos CCD 16 Lu, se debe mantener en DMEM-F12, sembrados con una densidad de 6×10^3 células /pozo en DMEM-F12, preincubadas 24 hrs bajo estas condiciones y 24 hrs más con DMEM suplementado con ITS y posteriormente agregar el factor de crecimiento a probar, durante 48 hrs.

III. Proliferación inducida por trombina en los fibroblastos de pulmón humano adulto.

Los resultados obtenidos con el desarrollo de la presente tesis, muestran que la trombina es un factor mitogénico para los fibroblastos de pulmón humano adulto normal (CCD 16 Lu), utilizados para este trabajo. Estos resultados concuerdan con lo que ya había sido reportado para fibroblastos de pulmón humano fetal (Hernández, 1995). En esta línea celular de fibroblastos, la trombina indujo una respuesta dosis-dependiente semejante a lo reportado para fibroblastos de pulmón humano fetal (IMR-90) (ver gráfica 2), solo que la dosis a la que se encontró una estimulación máxima ($56.6 \% \pm 0.1\%$) en esta línea celular de fibroblastos fetales fue 1×10^{-10} M mayor a la concentración a la que se encontró la estimulación máxima, inducida por trombina ($44 \% \pm 0.1\%$) en los fibroblastos de pulmón humano adulto (CCD 16 Lu, 5×10^{-11} M). En la sección de antecedentes se explicó detalladamente el mecanismo de regulación del ciclo celular, inducido por diversos factores de crecimiento, entre los que se encuentran la trombina. Cabe mencionar que

dentro del sistema de proliferación *in vitro*, con el que se trabajó en esta tesis, seguramente existen moduladores positivos y negativos de la proliferación celular, por lo que los efectos de proliferación que se evaluaron, son entonces el resultado del balance neto del efecto de estos moduladores sobre la división celular de los fibroblastos.

Las diferencias encontradas, en las concentraciones de estimulación óptimas inducidas por la trombina, en las dos líneas celulares de fibroblastos CCD 16 Lu y IMR-90, se debe posiblemente, a que el número de receptores para 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. (Coughlin, 1994).

Con esta parte del trabajo se logró cumplir uno de los objetivos de la tesis, que era conocer el efecto de la trombina en los fibroblastos de pulmón humano adulto y correlacionar la respuesta observada en estos fibroblastos, con el efecto ya reportado para la trombina en fibroblastos de pulmón humano fetal (Hernández, 1995).

IV. Mecanismos de proliferación inducidos por trombina

Existe evidencia experimental que sugiere, que la modulación fibroblástica inducida por los diferentes factores de crecimiento, es el resultado de la interacción entre ellos. Por ejemplo, se sabe que la trombina induce la expresión y secreción de factores de crecimiento, o bien induce su liberación de la matriz extracelular, tal es el caso del PDGF (Ohba, 1994), el TGF β (Taipale, 1992), el bFGF (Benezra, 1993), la endotelina-1 (Shani, 1989). Por otro lado, se sabe que el TGF β induce la secreción del PDGF (Leof, 1986) y que éste último puede a su vez, mediante el dímero BB inducir la expresión del TGF β . Es importante mencionar que se ha demostrado que cualquiera de estos factores son capaces de inducir una estimulación de la proliferación fibroblástica (Kelly, 1990).

Todas estas complejas relaciones, en las que está involucrada la trombina, factor de crecimiento estudiado en este trabajo, son una muestra de que la interacción entre diferentes citocinas, debe ser la base de la modulación fibroblástica y que es mucho más

compleja de lo que se piensa (Baltegan, 1990). Debe considerarse además, que existe un gran número de citocinas de las cuales se conocen poco y que no están bien caracterizadas todavía. Sin embargo, primeramente debemos entender la actividad moduladora inducida por los factores de crecimiento puros, para que posteriormente podamos integrar el conocimiento de las complejas interacciones que se establecen entre éstos y determinar su efecto en la modulación de los diferentes tipos de actividad biológica (Hernández, 1995).

En esta parte del presente trabajo, se trató de dilucidar la modulación fibroblástica, a nivel de proliferación realizada por la trombina en los fibroblastos de pulmón humano adulto (CCD 16 Lu). Al respecto en la literatura se ha reportado (Ohba, 1994), que a tiempos de 48 hrs, la trombina induce la expresión, la síntesis y la liberación de diversos factores de crecimiento, principalmente el PDGF. Como ya se mencionó en la sección de antecedentes, este ha sido caracterizado como un potente mitógeno para fibroblastos (Heldin, 1985) y del que además se sabe que cada forma estructural produce diferente efecto sobre la misma línea celular (Bonner, 1993). Para determinar la modulación inducida por este factor de crecimiento sobre la proliferación fibroblástica, en esta línea celular de fibroblastos, se realizó una curva dosis-respuesta para las diferentes formas estructurales del PDGF (AA, BB, AB, ver gráfica 7) y para el PDGF total (ver gráfica 8), observándose que la estimulación máxima de la proliferación fibroblástica fue inducida por la forma estructural AA, a una concentración de 32 ng/ml, lo que concuerda con lo sito en la literatura para otras líneas celulares de fibroblastos humanos (Heldin, 1985, Clark, 1989).

Para cuantificar la contribución específica de la trombina y el PDGF a la proliferación fibroblástica, se emplearon inhibidores específicos para cada factor de crecimiento; para la trombina (Hirudina y AT-III, ver gráfica 6) y el anticuerpo neutralizante de la actividad biológica Anti-PDGF para el PDGF.

Los resultados obtenidos demostraron que la proliferación inducida por trombina a las 48 hrs. es producida por la liberación al medio del PDGF (ver gráfica 9). Estos resultados concuerdan con lo que había sido reportado por Ohba y Col. en 1994, sin embargo, debido a que la hipótesis planteada en este trabajo, es que a tiempos cortos la trombina puede actuar por sí sola, se realizó una curva dosis-respuesta a trombina en el tiempo. Esta hipótesis se apoya en hechos como que el PDGF es un factor de crecimiento por competencia (Stilles, 1979), y el periodo de acción de este tipo de factores de crecimiento, tiene una duración de 18 hrs aproximadamente (Barsega, 1985), por lo que a tiempos más cortos no tendría tiempo de actuar. Con la realización de la curva en el tiempo (ver gráfica 10), donde se observó, que existían dos puntos de estimulación máxima de la trombina en el tiempo (previos al tiempo de 48hrs, en el cual ya se había estado trabajando) a las 8 y a las 28 hrs (gráfica 10). Con el desarrollo del presente trabajo, se demostró que la trombina es responsable del incremento en la proliferación fibroblástica inducida a las 8 hrs (ver gráfica 11) y solo parcialmente responsable a las 28 hrs (ver gráfica 12). La acción directa de la trombina a tiempos cortos, ya había sido reportada para fibroblastos de pulmón humano fetal por Hernández en 1995, lo cual había implicado a la trombina como importante agente en el establecimiento de la fibrosis pulmonar, pero era importante verificar el comportamiento de los fibroblastos de pulmón humano adulto, ya que estos ofrecen un modelo más cercano a la realidad, en el caso de los padecimientos fibróticos.

En esta tesis se investigó la modulación fibroblástica inducida en los fibroblastos de pulmón humano adulto (CCD 16 Lu), por la trombina, a nivel de proliferación celular. Estos resultados permitieron establecer que la trombina induce un incremento en la proliferación *in vitro* de esta línea celular. Con respecto a los mecanismos de proliferación que esta proteasa induce, se comprobó que existen tres picos de estimulación máxima de la proliferación fibroblástica en el tiempo, a las 8, 28 y 48 hrs; a las 8 hrs la estimulación de la proliferación se debe a la participación directa de esta proteasa, mientras que a las 28 hrs, ya existe una intervención importante del PDGF en la estimulación de la proliferación, finalmente a las 48 hrs, la estimulación de la proliferación se debe principalmente al PDGF liberado probablemente por la acción de la trombina.

CONCLUSIONES

- Se determinaron como condiciones óptimas de cultivo, precubación de 24 h con SBF al 2% e incubación de 48 h en presencia de ITS.
- La α -trombina indujo *in vitro* una estimulación de la proliferación fibroblástica, en forma dosis-dependiente. La dosis óptima de estimulación fue de 5×10^{-11} M.
- A dicha dosis se detectaron puntos de estimulación máxima a las 8 y 28, y 48 h.
- Mediante el empleo de inhibidores específicos de la actividad biológica de la trombina (hirudina y AT-III), se determinó que la estimulación en la proliferación fibroblástica, inducida por esta proteasa a las 8 h, era atribuible únicamente a la acción de la trombina.
- Mediante el empleo de inhibidores específicos de la actividad biológica de la trombina (hirudina, At-III), se determinó que la estimulación en la proliferación fibroblástica, inducida por esta proteasa a las 28 h, era atribuida parcialmente a la acción de la trombina.
- Mediante el empleo de un inhibidor específico de la actividad biológica del PDGF (Anti-PDGF), se determinó que la estimulación en la proliferación fibroblástica, inducida por la trombina a las 48 h era atribuida a la acción del PDGF.

Perspectivas futuras

El tipo de respuesta biológica evaluada en el presente trabajo (proliferación celular), podría ser explicada vía la actividad del receptor de trombina, el cual se sabe que posee 7 dominios transmembranales y está acoplado al sistema de proteínas G (Vu, 1991). Las señales de transducción inducidas por éste, se propagan hacia el núcleo y otros compartimentos por dos vías, la adenilato ciclasa y el fosfatidil inositol-fosfolipasa C, este último genera dos segundos mensajeros, el inositol-1,4,5-trifosfato y el diacil glicerol (Coughlin, 1994). Se sabe que estas señales de transducción inducidas por la trombina activan sistemas de protein cinasa de tirosina (ligadas a receptores de factores de crecimiento como el PDGF) y protein cinasas a mitógenos (MAP cinasas), constituidas por la familia de serina/treonina cinasas. Específicamente se ha demostrado que las MAP cinasas son importantes en la respuesta mitogénica inducida por la trombina en fibroblastos y células del músculo liso (Rabiet, 1994).

Aunque se conoce, lo antes mencionado sobre el receptor de trombina, todavía permanecen sin contestar preguntas como: ¿cuál es el papel de la trombina en la activación del receptor, una vez que la ruptura proteolítica ha sucedido?. ¿Cuál es el número de receptores que pueden ser activados por una sola molécula de trombina?. ¿Cuál es el mecanismo específico mediante el cual el dominio SFLLRN del receptor de la trombina, al quedar expuesto conduce a su activación?. Mismas que sería interesante considerar para investigaciones futuras.

, Sobre el mecanismo de proliferación inducido por trombina el cual se trato de dilucidar en este trabajo, sería importante saber :

¿Si la trombina es capaz de regular la síntesis del PDGF en el tiempo o solamente es capaz de liberarlo al medio?. ¿Si la trombina está modulando el número de receptores para PDGF en la superficie celular?. ¿Cómo actúa la trombina, en la regulación genética del ciclo celular?. ¿Cómo interactúa con otros factores de crecimiento?.

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFIA

Asthan, R.W and Sheraga, H.A. Preparation and characterization of anhydro-thrombin. *Biochem.* 1995;34: 6454-6463.

Barsega, R. The biology of cell reproduction. Cambridge, MA: Harvard University Press. 1985.

Bar-Shavit, R., Benezra, M. V., Sabbah, W., Bode, L., Vlodavsky, Y. Thrombin as a multifactor protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992;6:123-130.

Bar-Shavit, R., Sabbah, W., Lampugnani, M.G., Marchisio, P.C., Fenton, J.W., Vlodavsky, Y., Dejana, E. An Arg-Gly-Asp-sequence with thrombin promote endothelial cell adhesion. *J. Cell. Biol.* 1991;112:335-342.

Bar-Shavit, R., Elder, A., Vlodavsky, J. Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix: Protection and expression of functional properties. *J. Clin. Invest.* 1989;84: 1096-1104.

Bar-Shavit, R., Kahal, K.J., Mann, K.G., Wilher, G.D. Growth promoting effect of esterolytically inactive thrombin. *Cell. Biochem.* 1986;32:261-272.

Bar-Shavit, R., Kahnan, A.J., Mann, K.G., Fenton, W. Monocytes Chemotaxis stimulation by specific exosite region in thrombin. *Science.* 1983;220:729-737.

Baum, B. J., Moss, J., Breul, S.D., Berg, R.A., Crystal, R.G., Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized. *J. Biol. Chem.* 1980: 255; 2843-2847.

Benezra, M., Vlodavsky, I., Ishai-Michaeli, R., Neufeld, G., Bar-Shavit, R. Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor heparan sulphate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood.* 1983;81: 3324-3331.

Berk, B.C. Tauman, M.V., Grienglin, K.K., Fenton, J.W. Thrombin stimulates events in cultured vascular smooth muscle cell. *Biochem. J.* 1991;275: 799-805.

Bonner, J.C., Badgett, A., Osornio-Vargas, A.R., Hoffman, M., Brody, A.R. Differential proliferation of rat lung fibroblast proliferation is enhanced synergistically by receptor-recognized 2-macroglobulin. *J. Cell. Physiol.* 1990:145,1-8.

Bonner, J.C., Goodell, A.L., Coin, P.G., Brody, A.R., Chrysotile asbestos regulates gene expression and production of alpha-receptors for platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblast. *J. Clin. Invest.* 1993: 92: 425-430.

Brass, L.F., Ahuja, M., Belmont, E. Thrombin receptors: turning them off after turning them on. *Seminars in hematology*. 1994; 31(3): 251-260.

Bravo, R., Burkhardt, J., Curran, T., Muller, R. Estimulation and inhibition of growth by EGF in different A 431 clone is accompanied by the rapid of c-myc and c-fos oncogenes. *EMBO. J.* 1985;4; 1193-1197.

Berg, R.A. Intracellular turnover of collagen. En: Regulation of matrix accumulation. Mechem, R.P. (ed), Academic Press, New York. 1986:29-52.

Cambrey, A.D., Harrison, N.K., duBois, R.M., Black, C.M., Laurent, G.J., McAnulty, R. Fibroblast growth factors in the lungs of patients with systemic sclerosis. *Thorax*. In press. 1995.

Cambrey, A.D., McAnulty, R.J., Harrison, N.K., Dawes, K.E., Campa, J.C., Dubois, R.M., Laurent, G.J. Endothelin is present in lungs of patients with systemic sclerosis and stimulates lung fibroblast replication *in vitro*. *Am. Res. Respir. Dis.* 1992;145:A15.

Cheng, L.B., Buchanan, J.M., Mitogenic activity of blood component thrombin and prothrombin. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*. 1975;72;131-135.

Cockayne, D., Sterling, K. M., Shult, S., Mintz, K.P., Leyne, S., Cutrona, R. Glucocorticoids decrease the synthesis of type 1 procollagen mRNAs. *Biochemistry*. 1986;25; 3202-3209.

Cohen, S., Carpenter, G., King, L. Epidermal growth factor receptor protein kinase interactions. *J. Biol. Chem.* 1980;25;4534-4842.

Cormack, H.D. *Histología de Ham*. 1987. Harla. México. p. 152-165.

Coughlin, S.R., Molecular mechanisms of thrombin signaling. *Sem. Hematol.* 1994;31(4); 270-279.

Chambers, R.C., Dabbagh, K. Effect of thrombin on procollagen production and gene expression by human lung fibroblasts. *Am. J. Respir Crit Care Med.* 1996;153;a401.

Crouch, E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol)* 1990;259 : L159-L184.

Dawes, K.E. and Gray, A.J., Laurent, G.J., Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication. *Eur. J. Cell. Biol.* 1993;61;128-130

Denhardt, D.T., Edwards, E.R., Parlett, C.J.L. Gene expression during mammalian cell cycle. *Biochem Biophys. Acta.* 1985; 8865; 83-125.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Deuel, F.T., Senior, R.M., Huang, J.S., Griffin, G. L. Chemotaxis of monocytes and neutrophils to Platelet derived growth factor. *J. Clin. Invest.* 1982;69:1046-1049

Duncan, M.R., Berman, B. Persistence of a reduced collagen producing phenotype in cultures scleroderma fibroblast after short-term exposure to interferon's. *J.Clin. Invest.* 1987.;79:1318-1324.

Faller, D.V., Mundscha, L.T., Forman, L.W., Quiñones, M.A. V-mosupresses Platelet-Derived Growth factor (PDGF) type receptor autophosphorylation inhibits. PDGF-BB mediated signal traduction. *J. Biol. Chem.* 1994;269:5022-5029.

Fenton II, J. W., Villanueva, G.B., Osofu, F.A., Maraganore, J.M. Thrombin inhibition by huridin: how huridin inhibits thrombin homeostasis

Fenton II, J. W., Ofofu, F. A., Brezniak, D. V., Hassouna, H.L. Understanding homeostasis. *Hematol. Oncol. Clin.* 1993 : 1107-1119.

Furie, B. and Furie, B.C. Mechanism of vilamin K dependent gamma-carboxilation. *Blood.* 1990;75:753-762.

Frank, Th., F., Yang , S-LL, Chan , T. O. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF- activated phospatidilinositol -3 kinase. *Cell.* 1995;81: 727- 736.

Giald, A., Michael, R.P., Stewart, D.J., Sheppard, M., Corrin, B., Harmid, Q.A. Expression of endotelin-1 in lung of palltients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet.* .1993;341: 1550-1554.

Gray, A.J.,Reeves, J.T.,Harrison, N.K.,Winlove, P., Laurent,G.J. Growth factors for human fibroblast in the solute remaining after clot formation. *J. Cell. Sci.* 1990;96:271-274.

Gray, A.J., Bishop, E.J., Reeves, G.T., Laurent, G, J. Aa and Bb Chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblast. *J.Cell.Sci.* 1993;104:409-413.

Goldstein.R.H., Poliks,C.F., Smith, B.D. Fine. A Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in culture of human foetal lung fibroblast. *Endocrinology.* 1989;124;964-970.

Golub, T. R., Barker. G. F., Lovelt. M. , Guilliand, A. Fusion of platelet - Derived growht factor receptor β to a novel et s- lik gene, tel, in chronic Myelomono cytic Leukemia with t (5; 12) Chromosomal translocacion . *Cell.* . 1994; 77: 307-316.

Hartwing, J.H., Bokoch, G.M., Carpenter, ch. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ebds through phophoinositide de synthesis In permeabilized human Platelets. X. 1995; 82: 645-653.

Heldin, CH., Ostman, A., Westermark, B. Structure of Platelet-Derived Growth Factor implications functional properties Growth factor. 1993;8;245-252.

Hernández-Rodríguez, N.A., Cambrey, A.D., Mcanulty, R.J., Chambers, R.C., duBois, R.M., Black, C. M., Laurent, G.J. Evidence that thrombin acts as a fibroblast growth factor in pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1994; 149:A709.

Hernández-Rodríguez, N.A., Cambrey, A.D., Harrison, N.K., Gray, A.J., Chambers, R.C., duBois, R.M., Black, C. M., Laurent, G.J. Thrombin contributes of fibroblast mitogenic activity in the lung of patients with systemic sclerosis but not cryptogenic fibrosing alveolitis or sarcoidosis. *The Lancet.* 1995; 346:1071-1073.

Hunninghake, G.W., Hemken, C., Brady, M., Monick, M. Immune interferon is a growth factor for human lung fibroblast. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986;134; 1025-1028.

Jordana, M., Shulman, J., McSharry, C., Irving, L.B., Newhouse, T., Jordana, G., Gauldie, J. Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblast from controls and fibrotic tissue. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 137; 579-584.

Jimenez, S.A., Freundlich, B., Rosenbloom, J. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferon. *J. Clin. Invest.* 1984;74;1112-1116.

Khal, H., Vu., Virginia, I., Wheaton, et al. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature.* 1991;353; 674-677.

Kelley, J. Cytokines of the lung. *Am. Rev. Respir.* 1990; 32;577-583.

Kether, Ch., Shaw, E. D-Phe-Arg-CH₂Cl a selective affinity label for thrombin. *Thrombosis. Res.* 1979; 14; 968-973.

Kinsella, M.B., Smith, E.A., Miller, K.S., LeRoy, E.C., Silver, R.M. Espontaneous production of fibronectin by scleroderma alveolar macrophages. *Arthritis. Rheum.* 1989;32; 577-583.

Kivirikko, K. Collagen and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann. Med.* 1993;25; 113-126.

Korn, J.H. Sustrain heterogeneity in postaglandin-E₂. Synthesis of human derman fibroblast. Differences in PGE₂ synthetic capacity of sustrain are not stimulus restictes. *Arthritis. Rheum.* 1985; 28;315-322.

Koshland, D. Mitosis: Back to the basis. *Cell.* 1994;77;951-954.

Kovacs, E.J., Kelley, J. Lymphokine regulation of macrophage-derived growth factor secretion following pulmonary injury. *Am. J. Pathol.* 1985;121; 261-268.

Kurata, S.I., Hata, R.I. Epidermal growth factor inhibits transcription of type 1 collagen genes and production of type 1 collagen in cultured skin fibroblast in presence or absence of L-ascorbic acid 2-phosphate a long-acting vitamin C derivative. *J. Biol. Chem.* 1991;266:9997-10003.

Leof, E.B., Wharton, W., Van wyk, J.J., Pledger, W.J. Epidermal growth factor (EGF) and Somatomedin C regulate G1 progression in competent BALB /c-3T3 cell. *Exp. Cell. Res.*1981: 141; 107-116.

Liu,C.Y., Nossel, H.L., Kaplan, K.L. The binding of thrombin by fibrin. *J. Biol. Chem.*179:254;19421-10425.

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

Mc Anulty ,R.J., Laurent, G.J. Collagen and its regulation in pulmonary fibrosis. Thorax. EN PRENSA.

Mc Coy , B.J., Diegelmann,R.F., Cohen, I.K.. In vitro inhibition of cell growth, collagen synthesis, and polyhydroxylase activity by triamcinolone acetonide (40750). *Proc. Soc. Exp. Biol.Med.* 1980:163;2166--222.

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

Mauviel, A., Redini, F., Hartmann,D.J. Pujol, P., Evans, C.H. Modulation of human dermal fibroblast extracellular matrix metabolism by the lymphokine leukoregulin. *J. Cell. Biol*199:113;1455-1462..

Miller,E.J., Gray, S The collagen : an overview and up date. *Meth. Enz. Mol.* 1987: 144;3-41.

Muller, R., Bravo, J., Burckhardt, J., Currau, T. Induction of c-fos gene and protein by growth factor precedes activation of c-myc. *Nature.*1984:312;716-720.

Newport, J., Yan,H. An analysis of the regulation of DNA synthesis by cdk2, cip1 and cinsing dactor . *J. Cell. Biol.* 1995:129;1-15

Nurdon, P., Heilmann E., Paponneau A., Nurdon, A. Two-way trafficaion of membrane glycoproteins on thrombin-activated human platelets. *Seminars of hematology.* 1994; 31(3): 240-250.

O' Connell, M. J., Nurse, P. How cell know they are in G₁ or G₂. *Current Opinion in Cell Biol* 1994; 6:867-871.

Ohba, T., Mc Donald, J.K., Silver, R.M., Strange, Ch., LeRoy, E.C., Ludwicka, a. Scleroderma bronchoalveolar lavage fluid contains thrombin, a mediator of human lung fibroblast proliferation via induction of platelet-derived growth factor α -receptor. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994; 10; 405-412.

Osornio- Vargas, A.R, Bonner, J.C, Baddgett, A., Brody, A.R. Rat alveolar macrophage-derived PDGF is chemotactic for rat lung fibroblast. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1990;3; 592- 602.

Osornio - Vargas, A.R, Kaller, V.G., Badgett, A. Hernández-Rodríguez, NA., Aguilar-Delfin, I., Brody, A.R. Early passage rat lung cell fibroblast do not migrate in vitro to transforming growth factor- β , *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1993;8;468-471

Oikarinen, J., Hatamochi, A. Crombrughe, B. Separate binding sites for nuclear factor and CCA AT DNA binding factor in the mouse α 2(1) collagen promoter. *J. Biol. Chem.* 1987;262;11064-11070.

Oliver, M.H., Harrison, N.K., Bishop, J.E., Cole, P.J., Laurent, G.J. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates application for assessment of growth factors. *J. Cell. Sci.* 1989;92; 513- 518.

Overall, C.M., Whana, J.L., Sodek, J. Independent regulation of collagenase 72KDa progelatinase and metalloproteinase inhibitor expression in human fibroblast. *J. Biol. Chem.* 1987;262;1850-1954.

Peacock, A.J., Dawes, K.E., Shock, A., Gray, A.J., Reeves, J.T., Laurent, G.J. Endotelin-1 and endothelin-3 induced chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblast. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992;7;492-499.

Philips, P.D., Pignolo, R.J., Christofalo, V.J. Insulin-like growth factor-1 specific binding to high affinity sites and mitogenic action throughout the life span of WI.38 cell. *J. Cell. Physiol.* 1987;133;135-143.

Pledger, W.J., Stiles, C.D., Antoniades, H.N., Scher, D. An ordered sequence of events is required before BALB / c-37 cell became committed to DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74; 4481-4490.

Postlethwait, A.E., Snyderman, Kang, H. A. The chioatractionof human fibroblast to lymphocyte-derived factor. *J. Exp. Med.* 1976;144;1188-1202.

Postlethwait, A.E., Seyer, J.M., Kang, H. A. The chioatractionof human fibroblast to type I, II, III, collagens an collagen-derived peplides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978;75;871-876.

Postlethwait, A.E., Keski-Oja, J., balain, G., Kang, H.A. Induction of fibroblast chamotaxis by fibronectin. Localization of the chemotactic region to a 140 000 molecular weigh non-gelatin

- Pierce, F.G., TA. Mustroe, B. W. Altmann, T.F., Duell, A. Thomason? Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J. Cell. Biochem.* 1991;45: 319-326.
- Prockop, GD.J., Kivirikko, K. Collagens. Molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Ann. Rev. Biochem.* 1995; 64: 403-434
- Rabiet, M.S., Plantier, S.L., Dejana, E. Thrombin-induced endothelial cell dysfunction. *Br. Med. Bulletin.* 1994;50:936-945.
- Robertis, E. D. 1988. *Biología molecular*. Ed. Atenea. 340-348 pp.
- Roberts, H.R., Lozier, J.N. Nuevas perspectivas sobre la cascada de la coagulación. *Hospital practice.* 1993;2 ; 150-160.
- Rosenberg, R.D. Regulation of the homeostatic mechanism. EN; Stamatoyannopoulos, G. eds. *Molecular Basis of blood and Diseases*. Philadelphia. WB. Saunders. 1987: 534-574.
- Ross, R. Platelet-derived growth factor. *Ann. Rev. Med.* 1987; 38: 71-79.
- Ruggon, M. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Seminars in hematology.* 1994, 31(3):229-239
- Saltzman, E.L., Moss, J., Berg, R.A., Hom, B., Crystal, R.G. Modulation of collagen production by fibroblast: Effect of chronic exposure to agonist that increases intracellular cyclic AMP. *Biochem. J.* 1992;204;25-30.
- Sato, N., Miyagima, A. Multimeric cytokine receptors: common versus specific functions. *Current. Opinion. in Cell. Biol.* 1994;6; 174-179.
- Singh, J.P., Adams, L. D., Bonin, P.D., Mode of fibroblast growth enhancement by human interleukin-1. *J. Cell. Biol.* 1988;106;813-819.
- Stilles, C.D., Capone, G.T., Sher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J., Pledger, W.J. Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-Derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76;1279-1283.
- Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S., Shiffman, E.J., Martin, G.R. Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblast. *J. Cell. Biol.* 1982;92;584-588.
- Stryer, L. 1988. *Bioquímica*. Ed. Reverte. 226-234, 267-283 pp.
- Shankar, R., Motte, C.A., Poptic, E.S., Dicorleto, P.E. Thrombin receptor-activating peptides differentially stimulate PDGF production, monocytic cell adhesion and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1994;269;13936-13941.

Taipale, J., Kolik., Keski-Oja, J. Release of transforming growth factor β -1 from the pericellular matrix of cultured fibroblast and fibrosarcoma cell by plasmin and thrombin. *J. Biol. Chem.* 1992;267:25378-25384.

Tani, K., Yosooka, S., Ogushi, F., Asocla, K., Fujisawak, T., Ssono, N., Ogura, T. Thrombin enhances lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell.Mol.Biol.* 1991;92:584-588.

Tominaga, S., Lengyel, P. β -interferon alters the pattern of protein secreted from quiescent and platelet-derived growth factor-treated BALB/c-3T3 cells. *J.Biol.Chem.* 1985;260: 1975-1978.

Varga, J., Jimenez, S.A., Rosenbloom, J. Transforming growth factor- β (TGF β) causes and persistent increase in steady-state amount of type I and type II collagen and fibronectin mRNA in normal human dermal fibroblast. *Biochem. J.* 1987;247:597-604.

Vu, T. K., Wheaton, V. I., Hung, D.T., Charo, I., Coughlin, S.B. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature.* 1991;353:674-677.

Whai, S.M., Gately, C.L. Modulation of fibroblast growth factor by a lymphokine of human T cell and continuous T cell line origin. *J. Immunol.* 1983;130:1226-1230.
ad. Sci. USA

Wharton, W., VanWyk, J.J., Pledger, W.J. Inhibition of BALB/c 3T3 cell late in G1: commitment to DNA synthesis controlled by somatomedin C. *J. Cell. Physiol.* 1982;197:31-39.

Wilkie, A.M.O., Morrison-Kay, G.M., Jones, E.Y., Heath, J.K. Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Current. Biol.* 1995;52:500-507.