



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

68
23

FACULTAD DE QUIMICA

LA TROMBINA COMO MEDIADORA DE ACTIVIDAD
BIOLOGICA DE FIBROBLASTOS DE
PULMON HUMANO ADULTO
(QUIMIOTAXIS)

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
QUE PRESENTA:
SILVIA FALCÓN CARMONA

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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.

JURADO ASIGNADO:

- Presidente:** Profr. Homero Hernández Montes.
Vocal: Profr. Fernando García Tamayo.
Secretario: Profra. Norma Alicia Hernández Rodríguez.
1er. Suplente: Profra. Eva Delia Calderón Garcidueñas.
2do. Suplente: Profra. Elena Zambrano González.

Sitio donde se desarrolló el tema:

División de Investigación Clínica.
Instituto Nacional de Cancerología.

Asesor del Tema:



Dr. Norma Alicia Hernández Rodríguez.

Sustentante:



Silvia Fa Leo Carmona

La Realización de este trabajo fué financiado por:

Instituto Nacional de Cancerología

Proyecto Conacyt 4990-M9406.

*Los ideales que han iluminado mi camino, y
que una y otra vez me han infundido valor
para enfrentarme a la vida con buen ánimo,
han sido la bondad, la belleza y la verdad.*

- Albert Einstein

✦ A Dios:

Por darme la oportunidad de
vivir ese sueño que hoy
ya es realidad.

✦ A mis padres:

Por brindarme siempre su amor,
ternura, apoyo y confianza.
Por ser los guías que me enseñaron
el camino correcto. Los amo.

✦ A Han:

Por ser mi hermano y amigo en todo momento,
por compartir conmigo tus tristezas y alegrías.
Te quiero y deseo que esto te motive aún más en
todo lo que emprendas.

✦ A mi Tía Mela:

Con todo mi amor y cariño,
por permitirnos estar junto a ti.

✦ A Verónica:

Gracias por ser como eres, por enseñarme a
ser fuerte y sobretodo por compartir conmigo
lo más bello del mundo: Luisa Fernanda.

✦ A Fernanda:

Por ser lo más pequeño y lindo
que tengo en la vida.

✦ A la Dra. Norma Hernández:

Gracias por darme tu apoyo, tiempo, dedicación
y sobre todo tu paciencia y confianza en cada momento.
Sin ti no lo hubiese logrado.

✦ Al Dr. Homero Hernández M y

Dr. Fernando García T:

Por sus valiosos consejos y el tiempo dedicado a la revisión de éste
trabajo.

✦ A Adriana Contreras:

Gracias por tu apoyo, amistad y
por hacer más agradable la estancia en el
Instituto.

✦ A Julieta:

Gracias por tus consejos, apoyo y sinceridad
y sobre todo por aquellos gratos recuerdos.

✦ A Claudia Sánchez:

Por ser mi gran amiga y hermana.
Gracias por estar siempre conmigo y decir
lo mejor en cada momento y sobre todo por enseñarme
a luchar por lo que uno ama.

✦ A Claudia Castro:

Porque contigo he aprendido que la distancia
y el tiempo no debilitan la amistad, al contrario
la fortalecen. Te quiero mucho.

✦ A Olga:

Por ser mi pequeña gran amiga.
Gracias, por tu amistad, sinceridad y apoyo,
por permitirme compartir tristezas y alegrías mutuas.

✦ A Mauricio:

Por brindarme tu apoyo incondicional, por enseñarme que en la
vida nada es fácil y sobre todo por tu invaluable amistad.

✦ A Aida y Elizabeth:

Por todos los sueños y esperanzas que un día
compartimos. Gracias porque con ustedes he aprendido
que la amistad no sabe de rencores.

✦ A Lalo y Lino:

Por todas esas aventuras que vivimos
juntos. Porque cuando los conocí mi vida
en la facultad fue diferente. Mil gracias.

✦ A mis amigos:

*Claudia Córdova, Adriana, Nelly, Ana, Nancy, Veru, Cinthya,
Ismael, Agustín, Alejandro, Samuel, José Luis, Zenón, Saúl, Francisco,
gracias por su amistad y por los bellos momentos que hemos compartido.*

✦ A Carlos Magaña:

*Por ser mi primer amigo en la
facultad, en aquellos momentos difíciles.
Gracias.*

✦ A mis compañeros y alumnos del IVS:

*Gracias por permitirme vivir una experiencia maravillosa
con ustedes, por su cariño y sobre todo porque con ustedes he
aprendido una virtud: ser paciente.*

✦ A mi tía Ale:

*Por todo tu amor, apoyo y comprensión.
Gracias por ser como eres.*

♥ Fa



INDICE:

INDICE GENERAL	1
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	4
ABREVIATURAS EMPLEADAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCION	8
CAPITULO 1	
ANTECEDENTES	12
I. Fibroblastos	13
1.1. Propiedades	13
1.2. Actividad Biológica	13
1.3. Quimiotáxis	14
1.4. Proliferación Celular	15
1.5. Colágenas	17
1.6. Mediadores de la Actividad Biológica	18
II. La α -Trombina	21
2.1. Propiedades	21
2.2. La Cascada de la Coagulación	21
2.3. Receptor de la α -Trombina	23
2.4. Actividad Biológica	24
2.5. Mediadora de Quimiotáxis	25
2.6. Mediadora de la Proliferación	26
2.7. Inhibidores de la Actividad de la α -Trombina	26
III. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	28
3.1. Propiedades	28
3.2. Receptores para PDGF	29
3.3. Actividad Biológica	30



3.4. Mediador de Quimiotaxis	30
3.5. Mediador de Proliferación	31
IV. Fibrosis pulmonar	31
CAPITULO 2	
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	33
I. Hipótesis	34
II. Objetivos	34
CAPITULO 3	
MATERIAL Y METODOS	35
I. Cultivo celular	36
A) Cuenta Celular	36
II. Quimiotaxis	37
A) Determinación de la Concentración óptima de gelatina para cubrir membranas de quimiotaxis	37
B) Técnica de Quimiotaxis	38
C) Cuantificación de la Migración Celular	39
D) Ensayo de Confirmación de Quimiotaxis	40
III. Determinación de la concentración óptima del Factor Derivado de Plaquetas (PDGF)	40
IV. Determinación de la concentración óptima de α -Trombina	41
V. Determinación de la contribución específica de la α -trombina a la quimiotaxis	41
A) Curva Dosis-respuesta de inhibidores de α -trombina	41
B) Determinación de la contribución específica de la α -trombina a la Quimiotaxis	41
VI. Determinación del mecanismo de quimiotaxis inducido por la α -trombina	42



VII. Determinación del efecto del PDGF sobre células previamente estimuladas con α -trombina	43
VIII. Modulación de la respuesta del PDGF por la α -Trombina	43
IX. Analisis estadístico	44
CAPITULO 4	
RESULTADOS	45
I. Cultivo celular	44
II. Quimiotáxis	46
A) Determinación de la Concentración óptima de gelatina para cubrir membranas de quimiotáxis	46
B) Ensayo de Confirmación de Quimiotáxis	47
III. Determinación de la concentración óptima del Factor Derivado de Plaquetas (PDGF)	48
IV. Determinación de la concentración óptima de α -Trombina	49
V. Determinación de la contribución específica de la α -trombina a la quimiotáxis	50
A) Efecto quimiotáctico inducido por la hirudina y la AT-III	51
B) Determinación de la contribución específica de la α -trombina a la Quimiotáxis	53
VI. Determinación del mecanismo de quimiotáxis inducido por la α -trombina	55
VII. Determinación del efecto del PDGF sobre células previamente estimuladas con α -trombina	57
VIII. Modulación de la respuesta del PDGF por la α -Trombina	58
CAPITULO 5	
DISCUSION	60
I. Estandarización de las condiciones óptimas de cultivo	61
II. Cuantificación de la quimiotáxis fibroblastica inducida por la α -trombina	62



III. Quimiotaxis inducida por la α -trombina en los fibroblastos de pulmón humano adulto.	63
IV. Mecanismos de quimiotaxis inducidos por α -trombina	64
CAPITULO 6	
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS FUTURAS	70
CAPITULO 7	
BIBLIOGRAFIA	71

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la morfología de un fibroblasto	15
Figura 2. Representación esquemática del Ciclo Celular	16
Figura 3. Representación esquemática de la Cascada de la Coagulación	22
Figura 4. Cámara de Quimiotaxis	38

CUADROS

Cuadro 1. Tipos de colágenos	17
Cuadro 2. Mediadores de la actividad biológica de los fibroblastos	20



ABREVIATURAS EMPLEADAS

AT III	Antitrombina III
DMEM-F12	Medio de Cultivo Dulbecco modificado de Eagle F12
E ₁ y E ₂	Prostaglandinas 1 y 2
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ET ₁	Endotelina I
FACIT	Colágenas fibrilares asociadas con triples hélices interrumpidas
b-FGF	Factor de Crecimiento básico para Fibroblastos
HK	Cinínógeno de alto peso molecular
IGF-I	Factor de Crecimiento semejante a Insulina
IL-1	Interleucina I
LDCCF	Factor Quimiotáctico para Fibroblastos Derivado de Linfocitos
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PK	Precalicrofina
PL	Fosfolípidos
PPACK	Inhibidor de trombina (D-Phe-Pro-Arg-CH ₂ Cl)
SBF	Suero Bovino Fetal
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
hpf	high power fields, observación a 100x en diez campos predeterminados



La α -trombina es una proteasa de serina que además de participar en la cascada de coagulación convirtiendo al fibrinógeno en fibrina, modula la proliferación, quimiotaxis y el metabolismo de la colágena de fibroblastos de piel de rata y de humano fetal. Se ha postulado que la proliferación fibroblástica inducida por la trombina, puede atribuirse a la liberación de otros factores como el PDGF. Con estos antecedentes y debido a que no se conoce el efecto de la trombina sobre la quimiotaxis de los fibroblastos del pulmón humano adulto, el objetivo de este trabajo fué demostrar este efecto en dichos fibroblastos (CCD16 Lu), así como determinar la participación del PDGF como posible mediador de ésta. La quimiotaxis se realizó utilizando microcámaras modificadas de Boyden de 48 pozos. Como control positivo se utilizó PDGF-BB en una dosis de 32ng/ml, como control negativo se empleó buffer de quimiotaxis solo. Para determinar la actividad específica de la trombina, se utilizaron dos inhibidores de dicha proteasa: hirudina (6.5×10^{-6} M) y Antitrombina III (0.075×10^{-8} M), así como el anticuerpo neutralizante de PDGF anti-PDGF (50 μ g/ml). El efecto inducido por la trombina se determinó en un amplio intervalo de concentraciones (10^{-11} a 10^{-9} M). En todos los casos se confirmó que los resultados obtenidos fueran quimiotaxis y no quimiocinésis. Los resultados se expresaron como promedio de 12 réplicas/punto \pm desviación estándar. En el caso de la curva dosis-respuesta a trombina, la máxima migración observada, fué de 52.7 ± 7 células/10hpf. Dicha migración disminuyó significativamente ($p < 0.05$), hasta en un 85 y un 82% en presencia de hirudina y AT-III, respectivamente. El anti-PDGF indujo una inhibición del 32%. Buscando una posible modulación entre la trombina y el PDGF, los fibroblastos que se someterían a quimiotaxis por PDGF, fueron estimulados previamente con trombina a 24 y 48 horas; observándose una disminución de la dosis óptima de PDGF requerida para inducir migración celular (16 ng/ml, 38 ± 3 células/10hpf). Estos resultados sugieren que la trombina estimula la quimiotaxis de



fibroblastos de pulmón humano adulto. Esta actividad está mediada por PDGF, al menos en forma parcial. Debido a dicha proteasa induce directa o indirectamente la replicación y la quimiotaxis de los fibroblastos de pulmón humano adulto, podría postularse que la trombina pudiese contribuir en la patogénesis de la fibrosis pulmonar.

INTRODUCCION



El tejido embrionario formado por células del mesodermo se conoce como mesénquima y a partir de este se desarrollan los tejidos conjuntivos del cuerpo, donde podemos encontrar ampliamente distribuidos a los fibroblastos. Este tipo de células es importante en los procesos normales de reparación como la cicatrización y también es probable que participen en procesos patológicos como la fibrosis pulmonar. La importancia de los fibroblastos en los procesos fibróticos pulmonares, se ha atribuido a que una de sus funciones principales es la producción de algunos componentes de matriz extracelular (Avery, 1966).

Se sabe que existen muchas citocinas o mediadores de la respuesta biológica de los fibroblastos, denominados factores de crecimiento, tal es el caso del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) (Seppa, 1982, Osornio, 1990), la trombina (Gray, 1990), la endotelina-1 (ET-1) (Cambrey, 1992), etc., que estimulan la quimiotáxis y proliferación de éstos. Así como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), que estimula la producción de colágenas (Varga, 1986). Algunos de estos factores de crecimiento han sido descritos en diferentes lesiones pulmonares (Goldstein, 1986).

Los factores de crecimiento por lo tanto son responsables de cierta forma, de una modulación en la respuesta biológica de los fibroblastos. Ya que los fibroblastos, constituyen el 40 % de la población celular del pulmón, y a que en pulmones de pacientes fibróticos, se ha reportado altas concentraciones de algunas citocinas y alteraciones en las funciones como la producción de colágenas, proliferación y quimiotáxis (Richards, 1991); el fibroblasto y su modulación inducida por factores de crecimiento son de suma importancia en el establecimiento de los mecanismos tempranos de la patogénesis de la fibrosis pulmonar.



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

Estos antecedentes destacan la importancia que pudiera tener la α -trombina en el establecimiento de patologías pulmonares como la fibrosis pulmonar. Debido a que la fibrosis es un estadio final de una serie de desórdenes, que tienen en común la acumulación de colágena (McAnulty, 1994), se ha postulado que los factores de crecimiento secretados por células pulmonares (fibroblastos, células epiteliales y endoteliales) o bien por células que circulan en el pulmón (macrófagos, neutrófilos, linfocitos) son los responsables de atraer a los fibroblastos a los sitios de lesión, estimulando su proliferación y así mismo la excesiva producción de colágena (Roberts, 1993).

Sin embargo, a la fecha no se ha demostrado el efecto inducido por la α -trombina en fibroblastos de pulmón humano a nivel de quimiotáxis, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo determinar la actividad que tiene la α -trombina como moduladora de Quimiotáxis sobre los fibroblastos de pulmón humano adulto. Como se mencionó anteriormente, la determinación de esta función biológica es de suma importancia, ya que se ha reportado como esencial en el establecimiento de una fibrosis pulmonar (McAnulty, 1991). En relación al efecto inducido por la α -trombina en fibroblastos de piel o de pulmón fetal, algunos autores sostienen, que la estimulación de la proliferación fibroblástica



inducida por esta proteasa de serina, puede atribuirse a la liberación de otros factores de crecimiento (Benezra, 1982, 1983, Ohba, 1994) como el PDGF (Shankar, 1994), el TGF β (Taipale, 1992), dFGF (Benezra, 1990), etc.

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se consideró como objetivo secundario la determinación de la participación del PDGF como mediador de la quimiotaxis inducida por la α -trombina en los fibroblastos de pulmón humano adulto.

A fin de facilitar la interpretación de la presente tesis, se incluyó una sección de antecedentes, en la que en forma general se revisan conceptos básicos, esenciales para el entendimiento de los resultados obtenidos en la misma. A continuación se presenta una sección de materiales y métodos donde se describe, las técnicas utilizadas en el desarrollo del trabajo. Posteriormente se presentan los resultados, la discusión de los mismos, así como las conclusiones.

Los resultados experimentales obtenidos con la realización de ésta tesis, permitieron cumplir los objetivos planteados y corroborar las hipótesis propuestas. Estos demostraron que *in vitro* la α -trombina induce quimiotaxis en fibroblastos de pulmón humano adulto. Dicha quimiotaxis se presentó en forma dosis dependiente y pudo atribuirse parcialmente a la acción de un segundo factor de crecimiento, el PDGF.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES



I. FIBROBLASTOS

1.1. PROPIEDADES

Los fibroblastos son células de origen mesenquimatoso, es decir, células derivadas del mesodermo embrional. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en el tejido conjuntivo fibroso. Tienen una forma alargada y poseen un núcleo elíptico (Avery, 1966). La característica principal de su citoplasma es la presencia de numerosas mitocondrias y un abundante retículo endoplásmico. Los fibroblastos al ser estimulados presentan una apariencia granular y basófila (Wilkie, 1995).

1.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA:

Se sabe que los fibroblastos participan en procesos normales de reparación como la cicatrización y que debido a su actividad biológica, están involucrados en algunos procesos patológicos como la fibrosis pulmonar (Laurent, 1981). Estos además de reproducirse, son capaces de sufrir quimiotaxis y producir algunos componentes de la matriz extracelular (McAnulty, 1995). A continuación describiré brevemente las características principales de cada una de las funciones biológicas, ejercidas por los fibroblastos, para luego profundizar en la actividad quimiotáctica, motivo de estudio en el presente trabajo.

Entre las actividades más importantes de los fibroblastos se encuentra su capacidad de migración *in vivo* o *in vitro* hacia ciertos factores, misma que ha sido llamada quimiotaxis (Kang, 1978, Faller, 1994). Un gran número de agentes quimiotácticos para fibroblastos han sido caracterizados, algunos de estos son: el Factor Quimiotáctico para Fibroblastos Derivado de Linfocitos (LDCFF) (Postlethwaite, 1976), los tripéptidos y dipéptidos de las colágenas tipo I, II, y III (Postlethwaite, 1978), y los fragmentos de la fracción 5 del complemento (C5a) (Postlethwaite, 1984).

Así como los fibroblastos son estimulados quimiotácticamente, existen algunos factores que los estimulan mitogénicamente. La proliferación celular desempeña un



papel muy importante en el desarrollo del tejido normal, la reparación de tejido dañado y el desarrollo de diferentes padecimientos, la pneumonitis, la bronquitis crónica, la fibrosis y el cáncer (Kauffman, 1980). Los fibroblastos intervienen en dichos procesos de reparación y cicatrización, debido al tipo de actividad biológica que desempeñan. Estos sintetizan numerosas proteínas que integran a la matriz extracelular: fibras de colágena, reticulares y elásticas, así como glucosaminoglucanos y glucoproteínas, las cuales proporcionan sostén y fuerza tensil a los tejidos (Prockop, 1995).

1.3. QUIMIOTAXIS:

El movimiento celular es una propiedad de gran importancia, ésta puede ser modulada por diversos factores presentes en el microambiente celular. Existen dos tipos de movimiento celular, la quimiocinésis y la quimiotáxis. En la primera de éstas, la migración de las células depende del gradiente de concentración de diversas sustancias químicas difusibles. En cambio la quimiotáxis, implica movilidad celular hacia una sustancia química específica, en forma independiente del gradiente de concentración. (Preston, 1990).

La movilidad celular de los fibroblastos, específicamente, se realiza mediante una extensión delantera llamada lamela, misma que se pone en contacto con la sustancia quimioatrayente y da origen a su morfología alargada. Esta extensión del fibroblasto carece de organelos, sin embargo, consta de un borde denominado lamilopodio, que está sujeto por fuerzas de adhesión locales. El borde está dirigido hacia el frente y de forma paralela al sustrato.

Una vez que el lamilopodio se adhiere al sustrato trae como consecuencia un movimiento en forma de olas conocido como "ruffling", mismo que hace que el fibroblasto migre. El movimiento del fibroblasto es lento, se calcula que aproximadamente se mueve 0.004-0.02 mm/s (ver figura 1).

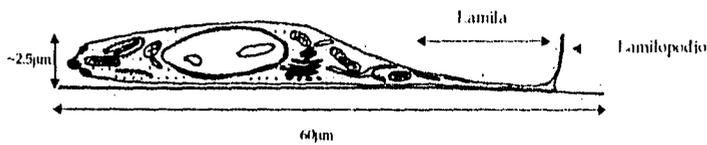


FIGURA 1. DIAGRAMA DE LA MORFOLOGIA DE UN FIBROBLASTO.

El lamilopodio que está formado por un conjunto de microfibrillas de actina, es lo que da a los fibroblastos una refracción que permite visualizarlos fácilmente al microscopio. En cuanto a la extensión que da movimiento a los fibroblastos, existen dos hipótesis que intentan explicar su formación. La primera propone un flujo lipídico direccional, que conduce a la extensión. La segunda involucra la activación de la vía del inositol fosfato que genera fuerzas osmóticas locales, siendo éstas últimas las que propician finalmente la formación de las fuerzas hidrostáticas, que promueve la polimerización de la actina. Cabe destacar que la formación de redes de actina, es la que da forma y estabiliza la forma cilíndrica del fibroblasto y sus extensiones (Preston, 1990).

1.4. PROLIFERACION CELULAR:

La célula como unidad viva fundamental, tiene la capacidad de reproducirse, al tiempo que transcurre para que se lleve a cabo dicha reproducción se le conoce como ciclo celular. El ciclo celular comprende muchos eventos que involucran tanto al núcleo como al citoplasma y consisten en una serie de eventos de biosíntesis que poseen una secuencia ordenada y específica (Avers, 1981, Berkalof, 1986).



La proliferación de los fibroblastos involucra una serie de eventos génicos y bioquímicos que para su estudio se han dividido en cuatro fases como se muestra en la figura 2 (Koshland, 1994).

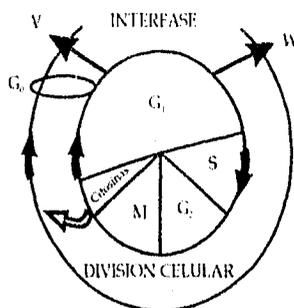


FIGURA 2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CICLO CELULAR.

La fase G₁ del ciclo celular es un periodo previo a la síntesis del DNA, durante esta etapa aumenta la síntesis de proteínas nucleares y citoplasmáticas. En la fase S se sintetiza el DNA, posteriormente durante la fase G₂ se incrementa la síntesis de proteínas nucleares. La fase M es la etapa mitótica, es decir, donde la célula se divide (O'Connel, 1994). Existe una quinta etapa en el ciclo celular, esta es la fase G₀, donde la célula se encuentra en un estado de reposo, antes de iniciar nuevamente el ciclo celular con la fase G₁. Para que la célula pase de la fase G₀ a la fase G₁, requiere ser estimulada por una señal bioquímica, ésta puede ser proporcionada por diferentes factores, como podrían ser diversos factores de crecimiento. Cabe mencionar que dichos factores, paradójicamente, también pueden inhibir la proliferación celular por mecanismos de retroalimentación (Murray, 1994).



1.5.COLAGENAS:

Como se mencionó anteriormente las colágenas son un grupo de proteínas relacionadas que forman la matriz extracelular. Estas proteínas, sintetizadas por los fibroblastos, se agrupan en grandes estructuras supramoleculares que interactúan a su vez con otros componentes de la matriz como la fibronectina, los proteoglicanos, la laminina y el nidogen. A la fecha se conocen 19 diferentes tipos de colágenas y se han descrito, al menos 30 genes involucrados en su codificación (Van der Rest, 1991, Shaw, 1991, Miller, 1992, Kivirikko, 1993, Prockop, 1995).

Debido a la importancia que tiene la síntesis de la colágena como una de las actividades biológicas de los fibroblastos, en el siguiente cuadro, se muestran los principales tipos de colágenas, así como su distribución en los diferentes tejidos. Cabe mencionar que estas proteínas de la matriz extracelular se han agrupado de acuerdo a sus características fisicoquímicas como el tamaño de sus cadenas α y el número de regiones triple helicoidales que poseen, en fibrilares, no fibrilares y colágenas FACIT (colágenas fibrilares asociadas con triples hélices interrumpidos) (Prockop, 1995).

CUADRO 1. TIPOS DE COLAGENAS

COLAGENAS	TIPO	DISTRIBUCIÓN EN EL TEJIDO
F I B R I L A R E S	I	Hueso, tendón, piel, tejido vascular, disco intervertebral
	II	Cartilago, ojo, disco intervertebral
	III	Tejido vascular
	V	Pulmón, piel, ojo, hueso, placenta, membranas fetales
	XI	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 córnea
	X	Placa de crecimiento epifiseal
F A C T I T	IX	Cartilago hialino y humor vítreo
	XII	Tendón y piel de embrión, ligamento peridental
	XIV	Tendón y piel fetal

1.6. MEDIADORES DE ACTIVIDAD FIBROBLASTICA

En la presente sección se revisarán brevemente las propiedades de los mediadores de la actividad fibroblástica, también llamados factores de crecimiento. Muchos de los cuales se han reportado como relevantes en padecimientos tales como la fibrosis pulmonar (Gauldie, 1993). Cabe mencionar que debido a que en el presente trabajo, se evaluará el efecto biológico inducido por la trombina y el PDGF a nivel de su efecto en la quimiotaxis de fibroblastos, se hará especial énfasis en los antecedentes, hasta ahora conocidos, de estos dos factores, mismos que serán revisados en las siguientes secciones.

Un gran número de mediadores de actividad fibroblástica han sido caracterizados (Kelley, 1990), la mayoría de estos, son de origen polipeptídico y afectan la producción de la colágena, estimulando directamente su producción o bien induciendo la quimiotaxis y la proliferación de los fibroblastos (Laurent, 1990) (Cuadro 2).



Antecedentes

Los mediadores polipeptídicos tales como el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1), los interferones α , β , y γ , la interleucina 1- α y β (IL 1- α y β), la insulina, el factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), las prostaglandinas E₁ y E₂, el ácido retinoico, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor transformante α y β (TGF α y β), el factor de crecimiento básico para fibroblastos (b-FGF), la endotelina-1 (ET-1), los corticosteroides, la fibronectina, etc., son producidos por diferentes tipos de células, tales como los macrófagos, los monocitos, los linfocitos, las células epiteliales y endoteliales y los mismos fibroblastos (McAnulty, 1995). Estos pueden funcionar como mitógenos solubles, esenciales en los procesos normales de cicatrización y como ya se mencionó anteriormente, participan en ciertas patologías como la fibrosis pulmonar (Kovacs, 1994).



CUADRO 2. MEDIADORES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FIBROBLASTOS

MEDIADOR	EFEECTO BIOLÓGICO	REFERENCIA
IGF-I	↑ Síntesis de colágena ↑ Proliferación	Goldstein, 1989 Phillips, 1987, Baserga, 1991
Interferón α	↓ Síntesis de colágena ↓ Proliferación	Jiménez, 1984 Duncan, 1987
Interferón β	↓ Proliferación	Tomimaga, 1985
Interferón γ	↓ Síntesis de colágena ↑ Proliferación	Jiménez, 1984 Hunninghake, 1986
IL 1- α y β	↑ Síntesis de colágena ↑ Proliferación ↓ Producción de colágena	Kahari, 1987, Frelney, 1994 Postlethwaite, 1983 Singh, 1988
Insulina	↓ Síntesis de colágena ↑ Producción de colágenas	Mauviel, 1991
PDGF	↑ Quimiotáxis ↑ Proliferación	Seppa, 1982 Oliver, 1989
Prostaglandina E_1	↓ Síntesis de colágena ↑ Degradación de colágena	Baum, 1980
Prostaglandina E_2	↓ Proliferación ↓ Síntesis de colágena	Saltzman, 1982 Oliver, 1989 ³²
Acido retinóico	↑ Proliferación ↓ Síntesis de colágena ↑ Quimiotáxis	Oikarinen, 1985 Gray, 1990, Peppelenbusch, 1995 Dawes, 1991
TGF- β_1	↓ Síntesis de colágena ↓ Degradación de colágena ↓ Producción de colágenas ↑ Inhibidores de metalo- proteinasa ↓ Quimiotáxis	Varga y Jiménez, 1990 McAnulty, 1991 Overall, 1989 Osornio-Vargas, 1993
TNF α	↓ Síntesis de colágena ↑ Proliferación	Vihrek, 1986 Mauviel, 1988
EGF	↓ Síntesis de colágena	Kurata, 1991
ET-1	↑ Proliferación ↑ Quimiotáxis	Cambrey, 1992 Peacock, 1992
Factor Activador de Fibroblastos	↑ Proliferación	Wald, 1983
Corticoesteroides	↓ Síntesis y producción de colágena ↓ Degradación de colágena ↓ Proliferación	Cockayne, 1986 McCoy, 1980, Oikarinen, 1987 McCoy, 1980, Postlethwait, 1981
Fibronectina	↑ Proliferación ↑ Quimiotáxis	Bitterman, 1983 Potts, 1995

↑ Incremento de la actividad biológica

↓ Disminución de la actividad biológica



II. LA α -TROMBINA:

2.1. PROPIEDADES:

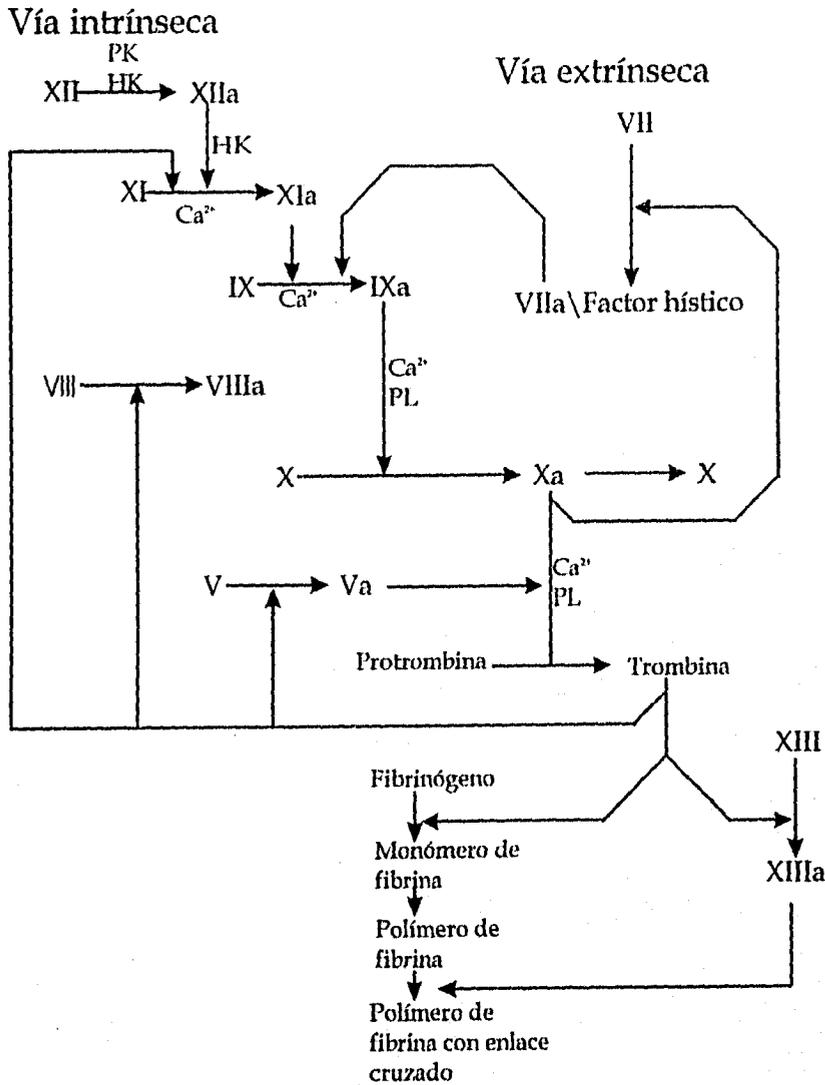
La α -trombina es una enzima clasificada como proteasa de serina, debido a la presencia del aminoácido serina en su sitio catalítico, aunque por el tipo de reacción que cataliza se considera una hidrolasa. Esta proteasa es de suma importancia en la cascada de la coagulación (Roberts, 1994), su peso molecular es de 37 000 Da, es sintetizada por las células parenquimatosas del hígado, en forma de protrombina y liberada a circulación. Se ha aislado trombina en diferentes especies, tales como la bovina, porcina y equina (Bar-Shavit, 1992, Ratnoff, 1977), y en diferentes formas, como la γ -trombina y ζ -trombina (Brezniak, 1990).

2.2. LA CASCADA DE LA COAGULACIÓN:

La cascada de la coagulación constituye un mecanismo natural de la hemostasis cuya acción fisiológica detiene la hemorragia de los vasos lesionados o deteriorados. Está constituida por una serie de reacciones enzimáticas, en las cuales se produce una activación de factores zimógenos, de tal forma que el factor activado opera en cada fase como la enzima que activa al zimógeno del paso siguiente (Roberts, 1994). Todos estos pasos conducen a la conversión de una proteína plasmática, en una proteína altamente polimerizada, denominada fibrina, cuyas redes constituyen el trombo hemostático que se forma. La conversión enzimática de fibrinógeno a fibrina la realiza la α -trombina, que deriva de la activación de la protrombina plasmática (Fenton, 1991). La cascada de la coagulación puede activarse por cualquiera de 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 lústico (factor III) (Williams, 1990, Meyer, 1985). En la figura 3 se muestran los pasos fundamentales en éste sistema que involucran a la α -trombina motivo de estudio en la presente tesis.



FIGURA 3 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA CASCADA DE LA COAGULACION





Uno de los pasos claves en la cascada de la coagulación es la formación de la α -trombina. Esta se forma a partir de la ruptura proteolítica de su precursor enzimático la protrombina, por un complejo enzimático denominado protrombinasa (Brezniak, 1990). La protrombinasa está constituida por el factor Xa, ligado al fosfolípido por medio de iones calcio y el factor V. Este complejo forma parte de una enzima funcional que comprende un centro activo, perteneciente al factor Xa, y al menos dos sitios de anclaje al sustrato: uno en el fosfolípido por calcio unido a la protrombina, y el otro en el factor V, expuesto por la acción proteolítica de la trombina previamente formada (Roberts, 1994). El fibrinógeno, sustrato natural de la trombina, es una molécula, estabilizada por cargas negativas de la extremidad N-terminal de sus cadenas A α y B β . La acción proteolítica de la trombina rompe al fibrinógeno, en dos extremos formando 2 fibrinopéptidos el A y el B, a los que se les denomina monómeros de fibrina. Dichos monómeros pueden polimerizar creando entonces, una red fibrilar organizada, misma que da lugar al trombo hemostático (Roberts, 1994, Meyer, 1985).

Por estudios de biología molecular realizados sobre el proceso de la coagulación, se han postulado nuevas funciones de la trombina (Roberts, 1994). Entre algunas de estas, se encuentran una activación de las plaquetas (Ruggeri, 1994), así como una facilitación de la activación y el ensamblaje de los demás factores y los cofactores sobre la superficie plaquetaria (Nurden, 1994). Cabe destacar que en ambos casos, se produce un incremento en la generación del factor Xa, la α -trombina, y la fibrina (Roberts, 1994).

2.3. RECEPTOR DE LA α -TROMBINA:

La α -trombina es reconocida por un receptor, constituido por una sola cadena polipeptídica, que posee siete dominios transmembranales acoplados al sistema de proteínas G (Baffy, 1994). Para la activación de éste, es necesario que la α -trombina fraccione catalíticamente, un segmento del receptor. Esto permite la exposición de una secuencia nueva de aminoácidos, muy específica (Bar-Shavit, 1991), misma que genera



diversas señales de transducción como la hidrólisis del fosfoinositocido, el incremento del Ca^{2+} citosólico, la formación de eucosanoides y la fosforilación de proteínas en residuos de serina, treonina y tirosina (Brass, 1994). Así mismo, la trombina pone en acción cascadas de proteínas cinasa, tales como la activación de mitosis vía la proteína cinasa (MAP), necesaria para el crecimiento de algunas células estimuladas con trombina como es la línea de megacarioblastos humanos CCL 39 (Chen, 1994).

Existe evidencia experimental que sugiere que el efecto mitogénico y quimiotáctico de la trombina, requiere que el receptor celular de la trombina, esté ocupado vía sus dos sitios activos, el de proteólisis y otro sitio de unión de alta afinidad (Bar-Shavit, 1991). Algunos estudios en los que se ha intentado demostrar el posible mecanismo de inducción de la proliferación fibroblástica por trombina, muestran que el di-isopropilflurofosfato 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 (Carney, 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 cercano al sitio activo de la molécula de trombina (Carney, 1986).

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

2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA:

Además de su función en la hemostasis, la α -trombina es capaz de inducir, otro tipo de actividad biológica muy diverso, entre otras se encuentra una estimulación quimiotáctica para monocitos (Bar-Shavit, 1993), y macrófagos (Bar-Shavit, 1993), activación de plaquetas (Martin, 1975, Hartwing, 1995). La α -trombina también



participa en procesos fisiológicos normales y algunos patológicos como la inflamación, la reparación de tejido, la aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, etc. (Bar-Shavit, 1992). Así mismo, se ha postulado su importancia en la fibrosis pulmonar asociada a Esclerosis Sistémica, debido a que se encuentra en alta concentración en lavados bronqueolaveolares de este tipo de pacientes (Hernández, 1995). Por otro lado se ha demostrado que la α -trombina, además degrada algunos componentes de la matriz extracelular e induce proliferación celular en fibroblastos de pulmón de hamster (Chen, 1994), y células de músculo liso (McNamara, 1993) entre otras.

2.5. MEDIADORA DE QUIMIOTAXIS:

Aunque ha sido demostrado que la α -trombina es quimiotáctica para fibroblastos de piel de rata fetal y fibroblastos de prepucio humano (Dawes, 1993), esto no ha sido demostrado en fibroblastos de pulmón humano adulto razón por la cual se realiza el presente estudio.

Esta capacidad de la trombina para atraer fibroblastos 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. Cabe destacar la importancia que tendría este hecho, ya que se ha sugerido fuertemente la participación de la trombina en el desarrollo de diversos padecimientos pulmonares tales como la fibrosis y el cáncer pulmonar (Hernández, 1995, Nierodziz, 1992)

Los mecanismos mediante los cuales la α -trombina ejecuta la respuesta quimiotáctica parece no ser de tipo enzimático, ya que se ha comprobado que las formas catalíticamente inactivas de esta proteasa de serina mantienen dicha actividad biológica.

Actualmente existe una controversia, en cuanto al papel que desempeña la α -trombina como agente mitogénico y quimiotáctico para fibroblastos. Algunos



investigadores postulan que estas respuestas son consecuencia de la liberación de otros factores de crecimiento tales como el PDGF, cuya función como estimulante de la proliferación y agente quimiotáctico para fibroblastos están comprobadas ampliamente (Ohba, 1994, Harlan, 1986). Por esta razón, en el presente trabajo cuyo objetivo es demostrar el efecto quimiotáctico de la trombina, se trabajará también con el PDGF a fin de comprobar dicha relación, documentada en proliferación, pero ahora en el caso de la quimiotáxis de fibroblastos.

2.6 MEDIADORA DE PROLIFERACION:

A la fecha se ha documentado ampliamente, que la α -trombina es capaz de estimular mitogénicamente a células tales como los fibroblastos de pulmón humano fetal (IMR-90, HLF-1) y adulto (CCD 34 LU) (Hernández, 1995, Ohba, 1994), los fibroblastos de piel de rata fetal, los fibroblastos de prepucio humano (Dawes, 1993), los astrocitos, los macrófagos y las células de músculo liso (McNamara, 1993, Bar-Shavit, 1992).

2.7. INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE LA α -TROMBINA:

La actividad catalítica de la trombina puede ser inhibida por diferentes sustancias. Estos inhibidores pueden ser naturales como la Antitrombina III (de origen natural), y la hirudina (no proveniente del cuerpo humano) o bien, sintéticos como el PPACK (D-Phe-Pro-ArgCH₂Cl) (Fenton, 1993).

i) ANTTROMBINA III:

La antitrombina III humana tiene un peso molecular de 58,000 Da. Un análisis de la estructura primaria de este inhibidor, demuestra que está constituido por ciertos dominios como el sitio reactivo, sitios de unión potencial a la heparina, una conformación sensible a triptofano, así como algunos enlaces disulfuro. La



antitrombina 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) (Fenton, 1993).

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

ii) HIRUDINA:

La hirudina es un inhibidor específico y altamente selectivo para la trombina. Este se obtiene de la saliva de la sanguijuela medicinal europea *Hirudo medicinalis*, sin embargo en estudios recientes, se han encontrado algunos residuos protéicos iguales o semejantes, en otras especies más populares de sanguijuelas. 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 exosilio es ocupado por la parte final aniónica del inhibidor (Fenton, 1991).

iii) 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 éstos, se piensa que alquilan el 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 (Keltner, 1979).

III. FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

Debido a que con el desarrollo de la presente tesis, se pretende determinar si el efecto quimiotáctico inducido por la α -trombina en fibroblastos de pulmón humano, es mediado por el PDGF. En la siguiente sección se revisarán brevemente las principales propiedades de dicho factor de crecimiento y el porque se piensa, podría mediar el efecto biológico inducido por la trombina.

3.1. PROPIEDADES:

El PDGF es un mediador de la quimiotaxis y proliferación de los fibroblastos, que ha sido estudiado muy ampliamente (Heldin, 1993). Este factor de crecimiento es una proteína dimerica cuyo peso molecular es de 30,000 Da. Esta consta de dos cadenas polipeptídicas denominadas A (14,000 Da) y B (17,000 Da), unidas entre sí por puentes disulfuro (Ross, 1987). Las cadenas polipeptídicas del PDGF, pueden formar diferentes formas estructurales: dos homodímeros AA y BB y un heterodímero AB (Heldin, 1989).

Ross y colaboradores en 1974, demostraron por primera vez la existencia del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, en el suero. Previamente se había demostrado que éste se caracterizaba por ser un factor estimulador de la proliferación de algunas células (Ross, 1986). Aunque originalmente el PDGF fué aislado de los gránulos α de las plaquetas, que constituyen su principal sitio de almacenaje, ahora se sabe que éste potente mitógeno no sólo es secretado por las plaquetas, sino que también



es sintetizado por numerosas células entre las que se encuentran: los fagocitos mononucleares (Martinet, 1986, Shimokado, 1995), las células endoteliales (DiCorleto, 1983), las células de músculo liso (Walker, 1986), las células embrionarias, los megacariocitos, algunas células como las Swiss 3T3, las NRK y las HF transformadas con el virus del sarcoma de simio (ssv), la línea celular de osteosarcoma (U2-OS), etc. (Ross, 1986), así como también por los mismos fibroblastos (Heldin, 1989, Leof, 1986, Ross, 1990) sobre los cuales induce un incremento de su actividad mitogénica y quimiotáctica.

3.2. RECEPTORES PARA PDGF:

Las células susceptibles a la actividad de PDGF expresan sobre su superficie dos tipos de receptores denominados α y β cada uno de éstos difiere en su afinidad por las diferentes formas estructurales del PDGF. El receptor β se une con gran afinidad al monómero B del PDGF por lo que se une eficientemente al PDGF BB y con una afinidad menor al PDGF AB. El receptor α se une a las tres formas estructurales con la misma afinidad (Williams, 1989, Matsui, 1989, Bonner, 1993). Los receptores del PDGF poseen dominios intracelulares con actividad de tirosin cinasa, que se estimula con la unión al PDGF (Franke, 1995). Una vez que el PDGF interactúa con las células blanco, es decir, células cuya superficie tiene alguno o ambos receptores, se dimeriza el receptor y se desencadenan diversas señales de transducción (Wennström, 1994). Algunas de las más documentadas son la autofosforilación del receptor y el cambio en la polaridad de los fosfolípidos de la membrana celular, la activación de la fosfolipasa C- γ , y el fosfatidil inositol 3 cinasa C (Faller, 1994). Se piensa que esta fosforilación de residuos de tirosina por el receptor, se relaciona íntimamente con la mitogénesis, así como con otras actividades biológicas del PDGF (Westermarck, 1990).



3.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA:

A pesar de que las diferentes formas estructurales del PDGF, están muy relacionadas entre sí, cada una de éstas induce un efecto biológico diferente. Ejemplo de esto, es la estimulación de la actividad quimiotáctica inducida por el PDGF-BB, en células de músculo liso (Martinet, 1987), fibroblastos (Seppa, 1982) monocitos y neutrófilos (Deuel, 1982) misma que es inhibida por el PDGF-AA (Osornio-Vargas, 1991). Por otro lado, la actividad mitogénica es estimulada en células mesenquimatosas solo por el dímero AA (Heldin, 1984, Clark, 1989). La respuesta mitogénica, así como la quimiotaxis, dependerá entonces del número, y tipo de receptores de las células, y de la concentración de los dímeros del PDGF, presentes en el microambiente celular.

Como resultado de su papel como potente mitógeno y quimioatrayente para fibroblastos pulmonares el PDGF se ha ligado a procesos de cicatrización heridas. Cuando existe una lesión de tejido, las plaquetas se depositan y se agregan en el sitio de lesión liberando PDGF, éste actúa entonces, como quimioatrayente de numerosos monocitos que maduran a macrófagos (Shimokado, 1985), mismos que a su vez empiezan a liberar diversos factores de crecimiento como son el mismo PDGF, el TGF- β , el b-FGF, etc. que inducen un incremento de la multiplicación celular y por ende una regeneración de tejido conectivo, regeneración epitelial y en algunos casos extremos el desarrollo de patologías como fibrosis debido a que estos factores, también regulan el depósito de proteínas de la matriz extracelular, como la colágena (Pierce, 1991, Clark, 1989).

3.4. MEDIADOR DE QUIMIOTÁXIS:

Se ha demostrado ampliamente, que otra de las funciones del PDGF, es su capacidad de quimioatracción para algunas células como los fibroblastos de pulmón de rata (Osornio, 1990, 1995), células de músculo liso (Bornfeld, 1995) los fibroblastos de piel humana (Soma, 1994), los monocitos y los granulocitos (Deuel, 1982, Siegbahn,



1990). La respuesta quimiotáctica al PDGF va a ser diferente a cada una de las formas estructurales del PDGF, tal es el caso de las células de ratón Swiss 3T3 que presentan una migración celular a las formas AB y BB, y aunque la forma estructural AA también estimula la migración no es con el mismo potencial que presentan las anteriores (Osornio-Vargas, 1995).

3.5. MEDIADOR DE LA PROLIFERACIÓN:

Así mismo, destacan entre las funciones biológicas del PDGF, su potente acción como estimulador mitogénico (Seiferal, 1994) de numerosas células: por ejemplo están las de origen mesenquimatoso (Pierce, 1991, Deuel, 1982), gliales, del músculo liso y los fibroblastos de pulmón de rata (Bonner 1990). De igual forma que en la quimiotáxis la respuesta de proliferación hacia el PDGF va a variar de una forma estructural a otra.

IV. FIBROSIS PULMONAR:

La fibrosis pulmonar es una enfermedad que puede ser provocada por diversos factores y cuyo desarrollo, ocasiona una insuficiencia respiratoria que progresa hasta la muerte. La fibrosis pulmonar está caracterizada por un incremento en la producción de proteínas de la matriz extracelular y consecuentemente una alteración en el número de espacios relacionados con las células del parénquima. Este incremento en la producción de las proteínas de matriz, se ha atribuido a la proliferación y activación de los fibroblastos pulmonares. Dicha proliferación se ha asociado a la participación de diferentes citocinas y mediadores inflamatorios que se ha reportado, se encuentran presentes en el lugar de la lesión pulmonar. Numerosos factores quimiotácticos potenciales, como son algunas proteínas de la matriz extracelular tales como las fibronéctinas y elastinas, o bien productos de la cascada de coagulación, como la trombina, mediadores inflamatorios y citocinas, entre los que destacan el factor de



crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), pueden promover la migración intersticial de los fibroblastos pulmonares. Dicha migración podría ser importante en el desarrollo de esta enfermedad, ya que si existe un mayor número de fibroblastos, estos podrían producir una mayor cantidad de colágena originado así, dicho padecimiento (Crouch, 1990, Cristal, 1991).

Las anomalías en el depósito de la colágena, se han atribuido a los cambios en el balance entre su síntesis y su degradación. En la fibrosis pulmonar caracterizada por un depósito excesivo de colágena y otras proteínas de matriz extracelular, este desequilibrio puede ser atribuido a la cantidad de colágena producida por las células en forma individual o bien por un incremento en la degradación de colágena (Mays, 1989, Laurent, 1982, McNulty, 1987, Labat-Robert, 1990). Los fibroblastos pulmonares, son los principales productores de la colágena pulmonar (Kirk, 1986, Seyer, 1976, Laurent, 1981, Reiser, 1981), por lo que podrían estar implicados en la regulación del depósito de esta proteína de matriz extracelular. Existen varias teorías al respecto, algunas postulan que los fibroblastos son quimioatraídos, y que al aumentar su número, aumenta la fuente potencial de colágena en el pulmón. Otras teorías sugieren que el aumento en la proliferación fibroblástica, redundaría en una alta producción de colágena. A partir de esto se deduce que cambios en la síntesis y degradación de la colágena podrían ser determinantes para el establecimiento de un proceso fibrótico.

CAPITULO 2

HIPOTESIS Y OBJETIVOS



I. HIPOTESIS :

- Si la α -trombina es un factor quimioatractivo de fibroblastos de piel humana, se esperaría que éste se comportara en forma semejante con los fibroblastos de pulmón humano adulto normal.

- Si el PDGF interviene en la respuesta mitogénica inducida por la trombina en fibroblastos de pulmón humano, podría esperarse que también mediara la respuesta quimiotáctica inducida por trombina en fibroblastos de pulmón humano adulto normal.

II. OBJETIVOS:

-Determinar si la α -trombina induce actividad quimiotáctica en fibroblastos de pulmón humano adulto normal (CCD 16 LU).

- Determinar si la quimiotáxis inducida por la α -trombina en fibroblastos de pulmón humano adulto normal (CCD 16 LU), es mediada por el PDGF.

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS



I. CULTIVO CELULAR:

Para el desarrollo de la presente tesis, se emplearon fibroblatos de pulmón humano adulto normal CCD 16 LU, (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco modificado de Eagle F12 (DMEM-F12, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), suplementada con suero bovino fetal al 10 % (SBF, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), en una atmósfera húmeda al 5 % de CO₂ y 37° C. Cabe mencionar que el medio también estuvo suplementado con aminoácidos no esenciales (0.08g/l) (Sigma, St Louis, MD, USA), vitaminas (Sigma, St Louis, MD, USA), penicilina-estreptomina (10,000U) (Sigma, St Louis, MD, USA) y glutamina (200 nM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA).

Se realizaron cambios del medio de cultivo cada tres días, hasta observar confluencia en los cultivos, momento en que se procedió a dar un pase celular subsecuente para el mantenimiento de la línea. En todos los experimentos realizados, las células se encontraron entre los pases 6 y 14.

A) CUENTA CELULAR.

Después de tripsinizar las células se tomó una alícuota de 20 µl de la suspensión celular y se agregaron 20 µl de azul tripán al 0.05% en solución 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 glóbulos blancos, calculando:

$$\# \text{ de células / ml} = \frac{\# \text{ de células}}{4} \times 2 \times 15 \times 10^3$$



donde: 4: Número de cuadros contados
2: Dilución 1:2 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:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\# \text{ de células teñidas}}{\# \text{ de células totales}} \times 100$$

II. QUIMIOTAXIS:

A) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE GELATINA PARA CUBRIR LAS MEMBRANAS DE QUIMIOTAXIS:

Antes de realizar los experimentos de quimiotáxis se determinó la concentración ideal para cubrir las membranas de policarbonato (Nucleopore, Cabin John, MD; USA), dichas membranas con poros de 8 µm de diámetro fueron cubiertas con dos diferentes concentraciones: 0.07 y 0.14 % de gelatina tipo A 275 G-8 500 (Fisher Scientific, USA).

Las membranas se lavaron con ácido acético al 0.5 %, durante 20 minutos a 50° C. Posteriormente se lavaron tres veces con H₂O destilada y se incubaron con la gelatina durante 1 hora a 100° C. Transcurrido este tiempo las membranas se dejaron secar en el horno a 100°C durante 1 hora. Las diferencias entre una y otra concentración se determinaron al observarlas al microscopio y cuantificando la migración celular de un control positivo.

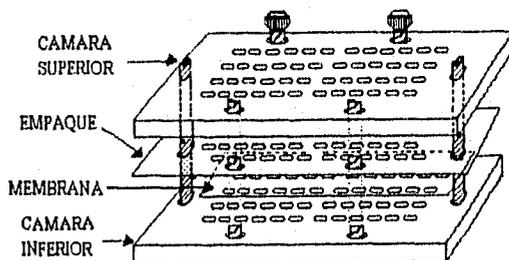


B) TECNICA DE QUIMIOTAXIS:

Los fibroblastos de pulmón humano adulto (CCD 16LU), se sembraron a una densidad de 4×10^4 células/cm² en cajas de cultivo de 25 cm², se crecieron durante 5 días en medio DMEM suplementado con SBF al 10 %. Estos se mantuvieron 5 días sin cambio de medio ya que es el tiempo que requieren para alcanzar confluencia y para de esta forma, asegurarse de que el medio ya no tuviese ningún rastro del suero y que pudiera interferir con los resultados de las quimiotaxis. Una vez transcurrido este período de tiempo, las células se incubaron durante 1 hora con DMEM sin suero, posteriormente se resuspendieron en medio de quimiotaxis (DMEM adicionado con albúmina sérica humana al 1%, Sigma St Louis, MD, USA), hasta lograr una concentración final de 3.5×10^5 células/ml.

La quimiotaxis se realizó en cámaras de Boyden modificadas (Snyderman, 1981) de 48 pozos (Neuro-probe Inc., Cabin John, MD; USA), dichas cámaras constan de dos compartimentos separados por un empaque de silicón como puede observarse en la figura 4.

FIGURA 4. CAMARA DE QUIMIOTAXIS





En los pozos de la parte inferior de la cámara, se adicionaron las diferentes diluciones a prueba, el volumen fué de aproximadamente 29 μ l en cada uno de los pozos. Se evitó formar burbujas, que impidieran la migración celular, así como el derramar la solución, a fin de evitar contaminación de un pozo a otro. Posteriormente con ayuda de unas pinzas se colocó la membrana cubierta con gelatina, evitando nuevamente la formación de burbujas, enseguida se colocó el empaque y por último la parte superior de la cámara, se ajustaron las tuercas, para que de esta forma la cámara quedara cerrada. En los pozos de la parte superior, se adicionó la suspensión celular. El volumen de suspensión adicionado en cada pozo fué de 50 μ l.

En cada experimento de quimiotáxis se hicieron cuadruplicados de cada uno de los puntos y cada experimento se realizó tres veces. En dichos experimentos se empleó medio de quimiotáxis y PDGF-BB (32 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis MN, USA, concentración previamente optimizada, ver sección de resultados) como control negativo y positivo respectivamente.

A fin de permitir la migración celular las cámaras una vez llenas se incubaron 5 horas a 37° C en un ambiente húmedo al 5 % de CO₂.

C) CUANTIFICACIÓN DE LA MIGRACION CELULAR:

Una vez transcurridas las 5 horas de incubación, las membranas se extrajeron de las cámaras y se introdujeron a una solución de PBS, las células se fijaron con una mezcla Metanol-Etanol-PBS (1:1:2) y se tiñeron con el colorante eosina Y amarilla y posteriormente con el colorante azure, por último las membranas fueron introducidas en H₂O durante unos segundos para eliminar el exceso de colorante. Las membranas se montaron en un portaobjetos en el cual se fijaron y se observaron al microscopio. La cuantificación celular se realizó contando el número



de células que migraron en 10 campos preseleccionados a 100x (HPF "high-power fields").

D) ENSAYO DE CONFIRMACION DE QUIMIOTAXIS:

A fin de verificar que los resultados obtenidos con el desarrollo del presente trabajo, eran atribuibles a una quimiotáxis real inducida por la trombina o el PDGF y no al efecto de una quimiocinésis (migración al azar), se realizó un ensayo de confirmación de quimiotáxis.

En éste además de seguir las condiciones de la quimiotáxis, como se describió anteriormente, en algunos pozos no se adicionó ningún quimioatrayente (trombina o PDGF) en el medio contenido en la parte inferior de la cámara, mientras que en algunos otros se agregó la misma concentración de quimioatrayente (trombina o PDGF) en los medios adicionados a la parte superior e inferior de la cámara de Boyden.

III. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL FACTOR DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF):

Para conocer la concentración óptima de PDGF que estimulara quimiotáxis sobre los fibroblastos empleados para el desarrollo de la presente tesis, se utilizaron las tres formas estructurales del PDGF (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB). Se hicieron curvas dosis respuesta de cada una de éstas utilizando concentraciones establecidas por experiencia en laboratorio donde se trabajó, que iban desde 8 a 128 ng/ml (Osornio, 1990).



IV. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION ÓPTIMA DE

α -TROMBINA:

Para determinar la concentración óptima de trombina (Sigma St Louis, MD, USA), que estimulara quimiotácticamente a los fibroblastos se utilizó un amplio intervalo de concentración de esta proteasa de serina (7.8×10^{-13} M a 1×10^{-9} M en dobles diluciones). Dicho experimento se realizó por triplicado, utilizando en cada uno de éstos PDGF-BB (32ng/ml) como control positivo (concentración previamente estandarizada, ver más adelante).

V. DETERMINACION DE LA CONTRIBUCION ESPECIFICA DE LA TROMBINA A LA QUIMIOTAXIS:

A) CURVA DOSIS-RESPUESTA DE INHIBIDORES DE TROMBINA:

Antes de determinar la contribución específica de la trombina para inducir quimiotáxis sobre los fibroblastos, se trabajó con dos inhibidores específicos de la trombina: hirudina (Sigma, St Louis, MD, USA), y antitrombina III (Sigma, St Louis, MD, USA), a los que se les determinó el efecto quimiotáctico que presentaban por sí solos por medio de una curva dosis respuesta para cada uno, se utilizaron en el caso de la hirudina concentraciones que iban de 3.7×10^{-6} a 4.3×10^{-9} M y para la antitrombina III concentraciones de 1.2×10^{-7} a 7.5×10^{-10} M.

B) DETERMINACION DE LA CONTRIBUCION ESPECIFICA DE LA TROMBINA A LA QUIMIOTAXIS:

Como se mencionó anteriormente a fin de determinar la contribución específica de la trombina se trabajó con inhibidores específicos de la trombina,



hirudina y antitrombina III. Se trabajó con la dosis de trombina que estimuló óptimamente la quimiotaxis de los fibroblastos, previamente determinada, contra una dosis de los inhibidores capaz de bloquear dicho efecto y que no presentó ningún efecto quimioatrayente sobre los fibroblastos. En el caso de la hirudina la concentración que se utilizó fue 0.65×10^{-7} M, dicha concentración es 5×10^3 veces mayor a la concentración que teóricamente bloquearía el efecto de la trombina. La dosis de antitrombina utilizada fue 0.75×10^{-8} M y dicha concentración es aproximadamente 60 veces mayor a la dosis que teóricamente bloquearía el efecto de la trombina, y no presentó efecto quimiotáctico alguno.

VI. DETERMINACION DEL MECANISMO DE QUIMIOTAXIS INDUCIDO POR LA TROMBINA:

Considerando los resultados obtenidos en cuanto a la inducción de quimiotaxis por trombina, se intentó dilucidar el mecanismo de acción por el cual atrae a los fibroblastos CCD 16 LU.

Algunos autores (Benezra, 1992, 1993, Ohba, 1994) han explicado el efecto de estimulación inducido por la trombina en fibroblastos, vía la liberación de otros factores de crecimiento. Estos autores sostienen, que la trombina induce la expresión y secreción de factores de crecimiento, almacenados en forma activa en la matriz extracelular, tal es el caso de PDGF y TGF- β . A éstos últimos se les ha atribuido la estimulación la proliferación fibroblástica inducida por trombina en fibroblastos. A fin de dilucidar si la trombina por sí misma estimula la quimiotaxis de los fibroblastos o bien su acción es mediada por ejemplo por el PDGF, se trabajó con el anticuerpo monoclonal anti-PDGF (Sigma, St Louis, MD, USA). Se realizaron ensayos de quimiotaxis con mezclas de la trombina a la dosis óptima de



estimulación de quimiotáxis y el anti-PDGF en una concentración de 50 µg/ml que la bibliografía propone como óptima (Osornio-Vargas, 1995).

VII. DETERMINACION DEL EFECTO DEL PDGF SOBRE CELULAS PREVIAMENTE ESTIMULADAS CON TROMBINA:

Por estudios hechos anteriormente (Hernández, 1995) se postuló que la trombina podría tener un efecto modulador sobre los receptores específicos del factor derivado de plaquetas (PDGF), por lo que se realizó un experimento más, donde los fibroblastos fueron estimulados durante 24 y 48 horas antes de la quimiotáxis con trombina en concentración de estimulación quimiotáctica óptima (1.25×10^{-11} M). Posteriormente las células fueron sometidas a quimiotáxis realizando una curva dosis-respuesta a PDGF y se evaluó el efecto quimiotáctico inducido por éste factor de crecimiento después del tratamiento previo con trombina.

VIII. MODULACION DE PDGF POR TROMBINA:

Tomando en consideración los resultados de la sección VII, mismos que sugirieron que la trombina modulaba al receptor de PDGF (ver sección de resultados), se confirmó indirectamente dicho efecto intentando bloquear la quimiotáxis inducida por trombina con dosis de anti-PDGF más bajas (25 y 50 ng/ml).



IX. ANALISIS ESTADISTICO:

Los resultados se expresaron como promedios +/- desviaciones estándar y las diferencias estadísticas entre los diferentes puntos se determinaron empleando la prueba para datos paramétricos de t de Student, de dos colas. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como significativo.

CAPITULO 4

RESULTADOS



I. CULTIVO CELULAR:

Antes de realizar cualquier experimento se optimizaron las condiciones a las cuales se debían mantener a los fibroblastos antes del experimento. Debido a que en el suero se encuentran muchos factores de crecimiento que pudiesen interferir en los resultados, se determinó que el tiempo ideal de cultivo, a la densidad celular empleada, sin cambio de medio DMEM con SBF, era de 5 días ya que durante este tiempo los fibroblastos consumirían la mayor parte de dicho suero, evitando de esta forma resultados erróneos.

II. QUIMIOTAXIS:

A) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE GELATINA PARA CUBRIR MEMBRANAS DE QUIMIOTAXIS:

Para poder realizar las quimiotaxis, se determinó la concentración ideal de gelatina que cubriría las membranas. Se experimentó con dos diferentes concentraciones: 0.07% y 0.14% .

Para medir la migración celular en ambas membranas, se utilizó un control positivo de migración que fué suero humano normal al 20 %. Como se observa en el cuadro 1 de la sección de resultados, la concentración óptima de gelatina fué la de 0.14%, ya que además de permitir una mayor migración celular, físicamente presentaba una mejor apariencia, ya que al observarla al microscopio estaba cubierta completamente, las células no se observaban barridas como se observaba en la membrana cubierta con la menor concentración.



CUADRO 1
Optimización de la Concentración de Gelatina

Concentración de Gelatina	Número de células que migraron	Características de la membrana
0.07 %	57	Membrana con algunas secciones no cubiertas, las células no se adhieren bien
0.14 %	69	Membrana completamente cubierta, poros bien definidos.

B) ENSAYO DE CONFIRMACION DE QUIMIOTAXIS:

Con el fin de asegurar que los resultados obtenidos se debían a una quimiotáxis y no a un movimiento al azar (quimiocinesis), se realizaron ensayos donde se utilizó como control negativo, medio de quimiotáxis, dos controles positivos: trombina y PDGF-BB.

La confirmación de la quimiotáxis se realizó colocando en ambos pozos (inferior y superior) de la cámara de Boyden la misma dosis de los controles positivos. Los resultados de este ensayo se muestran en el cuadro 2, donde puede observarse que en este caso la migración inducida por trombina (2 ± 1 células/10hpf) y PDGF (5 ± 1 células/10hpf) no fué diferente a la observada en el control negativo, confirmando así la quimiotáxis. En los controles positivos la migración fué de: 46 ± 11 células/10 hpf y 23 ± 4 células/10 hpf para trombina (1.25×10^{-11} M) y PDGF (32 ng/ml) repectivamente.



CUADRO 2.
Ensayo de quimiotaxis.

Control Negativo (1)	Control Positivo: (2)		Ensayo de quimiotaxis: (3)	
	Th (1.25x10 ⁻¹¹ M)	PDGF-BB (32 ng/ml)	Th (1.25x10 ⁻¹¹ M)	PDGF-BB (32 ng/ml)
5 ± 1 células/10 hpf.	46 ± 11 células/10 hpf.	23 ± 4 células/10 hpf.	2 ± 1 células/10 hpf.	5 ± 1 células/10 hpf.

(1) Control negativo: Buffer de quimiotaxis

(2) Control positivo en una sola cámara: trombina y PDGF

(3) Químioatrayentes en ambas cámaras

III. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL FACTOR DERIVADO DE PLAQUETAS:

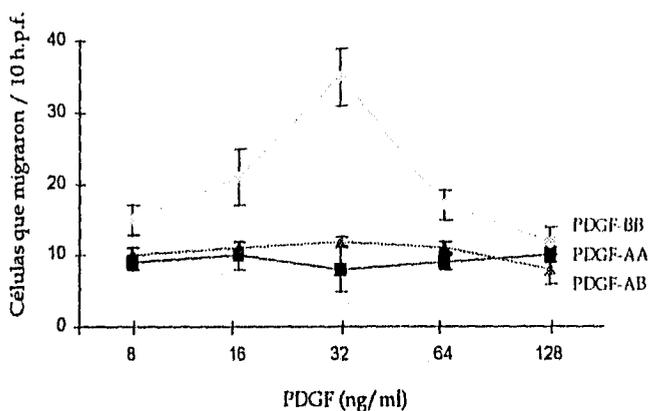
Debido a que se sabe que el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas es inductor de quimiotaxis sobre muchos tipos de células, se experimentó el efecto que tenía sobre los fibroblastos de pulmón humano adulto CCD 16 LU. Se realizaron curvas-dosis respuesta de las tres formas estructurales del PDGF (AA, AB, BB). Se trabajó con un amplio intervalo de concentraciones (8 ng/ml a 128 ng/ml en diluciones dobles).

La gráfica 1 muestra el efecto inducido por cada una de las formas estructurales del PDGF. Como se puede apreciar la forma estructural BB indujo un efecto quimiotáctico mayor que el inducido por las demás formas estructurales del PDGF. El efecto quimiotáctico máximo del PDGF-BB (36 ± 3 células/10hpf) se observó a una dosis de 32 ng/ml, dicha dosis se utilizó en los demás experimentos como el control positivo de migración celular. La forma estructural AB y AA del PDGF indujeron un efecto quimioatrayente casi nulo, 10 ± 1 células/hpf y 8 ± 3 células/hpf para PDGF-AB y -AA respectivamente. En este experimento, el control



negativo (medio de quimiotaxis solo) indujo solamente la migración de 4 ± 1 células/hpf.

GRAFICA 1.
Curva dosis-respuesta a PDGF



IV. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE TROMBINA:

Para determinar el efecto quimiotáctico de la trombina, se realizó una curva dosis-respuesta, en donde, como se mencionó anteriormente, se utilizó un amplio intervalo de concentraciones de esta proteasa de serina (1×10^{-9} , 15×10^{-11} , 10×10^{-11} , 7.5×10^{-11} , 5×10^{-11} , 3.75×10^{-11} , 2.5×10^{-11} , 1.87×10^{-11} , 1.25×10^{-11} , 0.94×10^{-11} , 0.63×10^{-11} , 0.31×10^{-11} , 0.15×10^{-11} , 0.07×10^{-11} M).

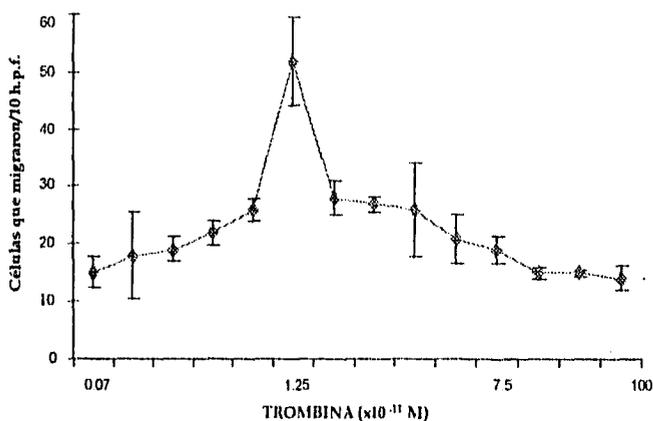
En la gráfica 2, se muestra que la trombina indujo un efecto quimiotáctico sobre los fibroblastos CCD 16 LU. La máxima migración estimulada por la trombina (52 ± 7 células / 10 h.p.f.), se observó a una dosis de 1.25×10^{-11} M. Cabe mencionar que dicho experimento se realizó tres veces empleado cuadruplicados de cada punto. Como control negativo se empleó medio de quimiotaxis que



presentó una migración de 7 ± 2 células/ 10 h.p.f. y como control positivo PDGF a una dosis de 32 ng/ml que presentó un efecto quimiotáctico de 36 ± 6 células/ 10 h.p.f.

GRAFICA 2.

Curva dosis-respuesta a trombina.



V. DETERMINACION DE LA CONTRIBUCION ESPECIFICA DE LA TROMBINA A LA QUIMIOTAXIS:

A fin de determinar la contribución específica de la trombina, al efecto quimiotáctico inducido sobre los fibroblastos de pulmón humano (CCD 16 LU), se trabajó con dos inhibidores específicos de la trombina, la hirudina y la antitrombina III. Primeramente se estableció si cada uno de éstos tenía algún efecto estimulador sobre la quimiotáxis de los fibroblastos. Posteriormente, se estableció la dosis óptima de inhibición de cada uno de éstos, al efecto inductor de la



quimiotaxis por la trombina, en dosis de estimulación óptima, para asegurar que el inhibidor bloqueara plenamente la acción de esta proteasa.

A) EFECTO QUIMIOTACTICO INDUCIDO POR LA HIRUDINA Y LA ANTIPTROMBINA:

Se trabajo con un amplio intervalo de concentraciones de Hirudina (37×10^{-7} , 27×10^{-7} , 18×10^{-7} , 14×10^{-7} , 9×10^{-7} , 7×10^{-7} , 4.6×10^{-7} , 3.5×10^{-7} , 2.3×10^{-7} , 1.7×10^{-7} , 1.1×10^{-7} , 0.84×10^{-7} , 0.6×10^{-7} , 0.4×10^{-7} M) y de Antitrombina III (12.0×10^{-8} , 9.6×10^{-8} , 6.0×10^{-8} , 4.8×10^{-8} , 3.0×10^{-8} , 2.4×10^{-8} , 1.5×10^{-8} , 1.2×10^{-8} , 0.7×10^{-8} , 0.6×10^{-8} , 0.35×10^{-8} , 0.3×10^{-8} , 0.15×10^{-8} , 0.075×10^{-8} M). Los resultados obtenidos se resumen en los siguientes cuadros.

CUADRO 3.

Efecto quimiotáctico inducido por la hirudina.

Concentración de Hirudina	% de Migración	SEM
37×10^{-7} M	16 %	2
27×10^{-7} M	15 %	3
18×10^{-7} M	16 %	1
14×10^{-7} M	13 %	2
9×10^{-7} M	13 %	3
7×10^{-7} M	15 %	2
4.6×10^{-7} M	20 %	2
3.5×10^{-7} M	13%	2
2.3×10^{-7} M	13%	3
1.7×10^{-7} M	13 %	2
1.1×10^{-7} M	16 %	3
0.8×10^{-7} M	11 %	2
0.6×10^{-7} M	13 %	2
0.4×10^{-7} M	15 %	2



Como se observa en el cuadro 3, el inhibidor específico para la trombina: la hirudina, indujo un porcentaje de estimulación de quimiotáxis muy bajo, con respecto al control positivo (PDGF a dosis de 32 ng/ml, 60 ± 10 células/ 10 h.p.f.), en todas las dosis se observó menos de un 20 % de migración, lo que equivale a menos de 12 ± 2 células. La migración del control negativo fué de 5 ± 2 células.

CUADRO 4.

Efecto quimiotáctico inducido por la Antitrombina III.

Concentración de AT-III	% de Migración	SEM
12×10^{-8} M	12%	1
9.6×10^{-8} M	14 %	0.8
6.0×10^{-8} M	12 %	0.5
4.8×10^{-8} M	6 %	0.8
3.0×10^{-8} M	10 %	0.3
2.4×10^{-8} M	10 %	1
1.5×10^{-8} M	12 %	0.4
1.2×10^{-8} M	12%	0.5
0.7×10^{-8} M	16%	0.4
0.6×10^{-8} M	14 %	0.7
0.35×10^{-8} M	10 %	0.9
0.3×10^{-8} M	10 %	0.4
0.15×10^{-8} M	10 %	0.4
0.075×10^{-8} M	12 %	1



En el cuadro 4 podemos observar que así como la hirudina, la antitrombina III también indujo, una estimulación quimiotáctica muy baja, en comparación con la inducida por el control positivo PDGF (32 ng/ml, 48 ± 3 células/hpf). El número máximo de células que migraron con la antitrombina III fué de 8 ± 0.4 células/hpf, equivalente a un 16 % de migración. El control negativo (medio de quimiotaxis) presentó una migración de 4 ± 1 células/hpf.

Estos resultados nos permitieron utilizar libremente ambos inhibidores para comprobar la contribución específica de la trombina, ya que por sí solos indujeron un efecto quimiotáctico mínimo, lo que aseguró que pudiesen existir interferencias con los resultados siguientes.

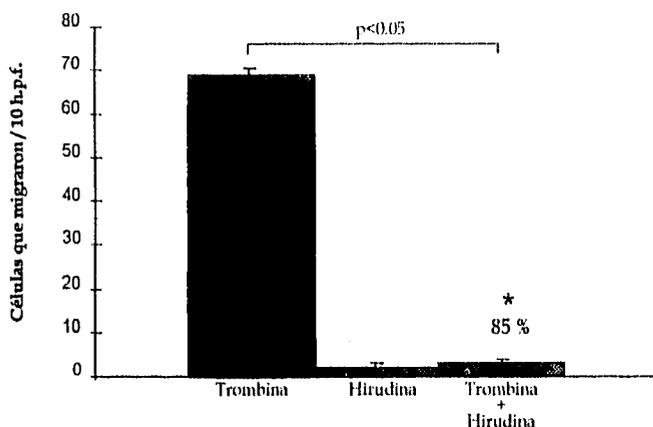
B) DETERMINACION DE LA CONTRIBUCION ESPECIFICA DE LA TROMBINA A LA QUIMIOTAXIS:

Una vez que se comprobó que los inhibidores de la trombina indujeron una estimulación quimiotáctica muy baja, sobre los fibroblastos CCD 16 LU, se prosiguió a observar el efecto quimiotáctico que se presentaba cuando se estimulaban a los fibroblastos con una mezcla de trombina y sus inhibidores. Se trabajó con un exceso de la concentración de hirudina y AT-III capaz de inhibir estequiométricamente la concentración óptima de trombina (1.25×10^{-11} M), en el caso de la hirudina se utilizó la concentración de 0.65×10^{-7} M y con la antitrombina se utilizó una concentración de 0.075×10^{-8} M.



GRAFICA 3

Efecto quimiotáctico de la trombina en presencia de hirudina.



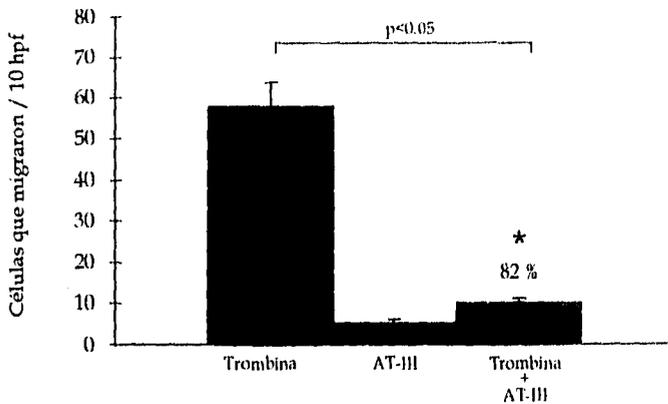
En la gráfica 3 se observa el efecto de migración inducido por la trombina en los fibroblastos CCD 16 LU a una dosis de 1.25×10^{-11} M, este fué de 70 ± 1 células/hpf. Así mismo se observó que la hirudina por sí sola no indujo efecto significativo en la quimiotáxis (2 ± 1 células/hpf). Sin embargo al mezclar hirudina junto con la trombina, se observa una inhibición significativa del efecto de la quimiotáxis inducida por la trombina hasta de un 85 % ($p < 0.05$).

En este experimento, el control positivo PDGF-BB (32 ng/ml) indujo una migración celular de 33 ± 4 células/hpf, mientras que en el control negativo (medio de quimiotáxis solo) se observaron solamente 3 ± 1 células/hpf.



GRAFICA 4.

Efecto quimiotático de la trombina en presencia de AT-III



En la gráfica 4 se observa el efecto de migración inducido por la trombina en los fibroblastos CCD 16 LU. A una dosis de 1.25×10^{-11} M, este fué de 58 ± 6 células/hpf. Así mismo se observó que la AT-III por sí sola no indujo efecto significativo en la quimiotaxis (5 ± 1 células/hpf). Sin embargo al mezclar AT-III junto con la trombina, se observa una inhibición significativa del efecto de la quimiotaxis inducida por la trombina hasta de un 82 % ($p < 0.05$).

En este experimento, el control positivo PDGF-BB (32 ng/ml) indujo una migración celular de 37 ± 4 células/hpf, mientras que en el control negativo (medio de quimiotaxis solo) se observaron solamente 3 ± 1 células/hpf.

VI. DETERMINACION DEL MECANISMO DE QUIMIOTAXIS INDUCIDO POR LA TROMBINA:

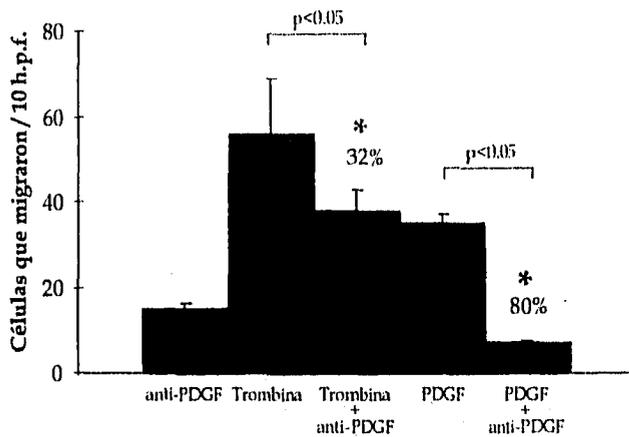
Una vez determinado que la trombina inducía un efecto quimiotático en los fibroblastos de pulmón humano adulto CCD 16 LU, se intentó dilucidar si el mecanismo de migración inducido por esta proteasa de serina estaba o no



mediado por la acción del PDGF. Se trabajó con trombina en su dosis óptima (1.25×10^{-11} M), misma que se incubó en presencia del anticuerpo neutralizante de actividad biológica del PDGF: anti-PDGF.

GRAFICA 5.

Efecto de la trombina en presencia de anti-PDGF



La gráfica 5 nos muestra que la quimiotaxis inducida por la trombina (59 ± 7 células/hpf) fué inhibida significativamente hasta un 32.5 % por el anti-PDGF ($p < 0.05$). Los controles internos del experimento corroboraron la validez del mismo.

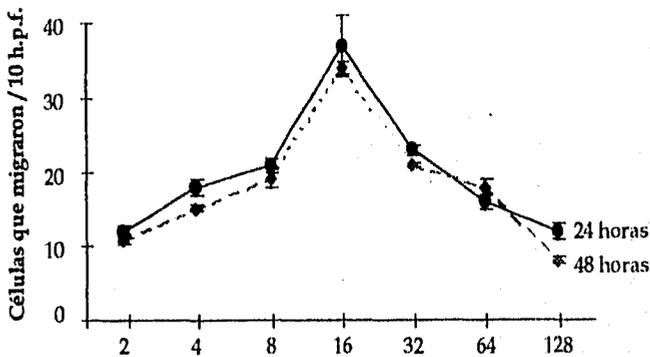
El anticuerpo anti-PDGF por si sólo indujo una migración celular baja (15 ± 1.2 células/hpf) además se observó una inhibición del 80% sobre la quimiotaxis inducida por el PDGF (40 ± 3 células/hpf), siendo esta muy significativa ($p < 0.05$). En el control negativo solamente se observaron 4 ± 1 células/hpf.



VII. DETERMINACION DEL EFECTO DEL PDGF SOBRE CELULAS PREVIAMENTE ESTIMULADAS CON TROMBINA:

Después de observar los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se postuló que la trombina podría tener un efecto modulador sobre los receptores específicos del PDGF. Entonces las células se estimularon con trombina durante 24 y 48 horas previamente a la realización de curvas dosis-respuestas a PDGF-BB (2-128 ng/ml).

GRAFICA 6.
Curva dosis-respuesta a PDGF



En la gráfica 6 podemos observar el efecto quimiotáctico inducido por las curvas dosis-respuesta a PDGF-BB después de la estimulación previa de 24 y 48 horas con trombina (dosis óptima, $1,25 \times 10^{-11}$ M). Se aprecia que la mayor migración celular, inducida por PDGF (35 ± 3 células/hpf y 32 ± 1 células/hpf a las 24 y 48 horas respectivamente), en las células estimuladas previamente con trombina, se presentó a una dosis menor (16 ng/ml) que la observada



anteriormente en el caso de células no pre-estimuladas con trombina (32 ng/ml). No se observó diferencia significativa entre ambos tiempos de pre-estimulación (24 y 48 horas) con trombina.

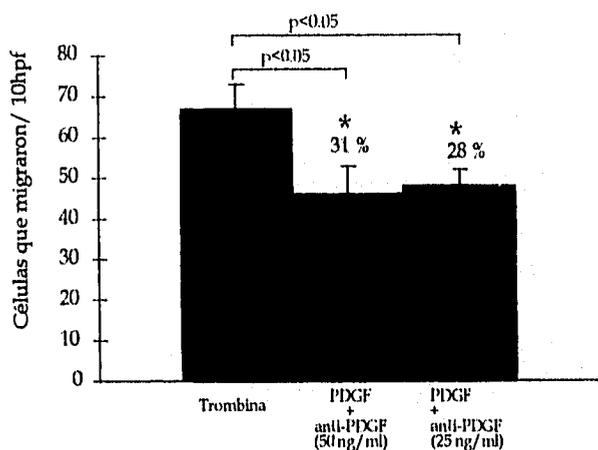
En este experimento, el control positivo trombina (1.25×10^{-11} M) indujo una migración celular de 35 ± 6 células/hpf, mientras que en el control negativo (medio de quimiotáxis solo) se observaron solamente 3 ± 1 células/hpf.

VIII. MODULACION DE PDGF POR TROMBINA:

Después de observar los resultados obtenidos en la sección anterior que sugieren que la trombina podría modular negativamente al receptor del PDGF, se realizó este experimento donde se utilizó el anticuerpo anti-PDGF a dosis mucho más bajas (25 y 50 ng/ml), para intentar inhibir el efecto quimiotáctico inducido por la trombina.

GRAFICA 7.

Efecto de la trombina en presencia del anticuerpo anti-PDGF





En la Gráfica 7 podemos observar que la trombina indujo un efecto quimiotáctico de 67 ± 6 células / hpf, dicho efecto se vió inhibido en un 31 y 28 %, con el anticuerpo anti-PDGF a dosis de 50 y 25 ng/ml, respectivamente. Dicha inhibición es significativa ($p < 0.05$), aún en estas concentraciones mucho más bajas que las anteriormente empleadas, lo que sugiere que el efecto de la trombina podría estar modulado vía el PDGF.

CAPITULO 5

DISCUSION



DISCUSION:

Con el desarrollo del presente trabajo se determinó que la α -trombina estimula la quimiotáxis de fibroblastos de pulmón humano adulto (CCD 16 Lu). Este hecho es relevante ya que recientemente se ha determinado el papel de la trombina en enfermedades como la fibrosis pulmonar (Hernández, 1995) y sólo se había reportado a esta proteasa de serina, como moduladora de dicha actividad sobre fibroblastos de piel de rata y de piel de humano fetal (Dawes, 1993), pero no sobre fibroblastos de pulmón humano adulto.

Debido a que en la literatura se ha reportado al PDGF como el factor de crecimiento responsable de la proliferación celular inducida por la trombina (Ohba, 1994), y además trabajos previos han demostrado que el PDGF es quimioatrayente para fibroblastos de pulmón de rata (Osornio, 1990, 1995) y fibroblastos de piel (Soma, 1994), otro de los objetivos de esta tesis fue dilucidar si el mecanismo de acción de la trombina para estimular la quimiotáxis fibroblástica, estaba mediado o no por el PDGF. Con el desarrollo de éste trabajo se comprobó que el PDGF si interfiere en la quimiotáxis inducida por trombina en los fibroblastos CCD 16 Lu, al menos en forma parcial.

A continuación analizaré algunos resultados y puntos relevantes para el desarrollo e interpretación de este trabajo.

I. ESTANDARIZACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE 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, a 37° C y en una atmósfera al 5 % de CO₂. Debido a que esta línea celular es incapaz de crecer sin suero, pero la presencia de éste en los experimentos podría ocasionar interferencias, antes de cada cuantificación de quimiotáxis los



fibroblastos se mantuvieron sin cambio de medio durante cinco días hasta confluencia total, además de un cambio de medio DMEM-F12 sin suero justo una hora antes de cada experimento, para eliminar cualquier posibilidad de interferencia con los residuos de suero del medio suplementado

II. CUANTIFICACIÓN DE LA QUIMIOTAXIS 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 (Hernández, 1995). En este caso específico la modulación fibroblástica a nivel de la quimiotáxis por la α -trombina.

El método para la cuantificación de la migración celular estimulada por la trombina utilizado en el desarrollo de este trabajo, está basado en el uso de cámaras de Boyden modificadas de 48 pozos (Postlethwaite, 1976, Falk, 1980), y membranas de policarbonato con poros de 8 μ m, cubiertas con gelatina. La gelatina que cubre las membranas proporciona cargas y además un medio de tracción para los fibroblastos. Uno de los primeros experimentos que realicé fue la determinación de la concentración adecuada de dicha gelatina. Aunque se han reportado concentraciones de gelatina de 0.07 % (Osornio, 1990) y de 0.05% (Postlethwaite, 1976), se concluyó que la concentración óptima, en este caso era de 0.14% ya que la membrana presentaba mejor cubierta y apariencia microscópica, además de una mejor migración a un control positivo.

Cabe destacar que un punto importante en la cuantificación de la quimiotáxis, es eliminar la posibilidad de que dicha migración sea sólo una migración al azar (quimiocinésis), ocasionada por un gradiente de concentraciones y no una migración dirigida y estimulada por un factor de crecimiento



(quimiotáxis) (Preston, 1990). Por lo que se realizó un ensayo de confirmación de la quimiotáxis (Osornio, 1990, Postlethwaite, 1976). Los resultados nos permitieron asegurar que los datos obtenidos en los experimentos realizados en esta tesis eran de una quimiotáxis verdadera y no de una quimiocinésis.

III. QUIMIOTAXIS INDUCIDA POR LA TROMBINA EN LOS FIBROBLASTOS DE PULMON HUMANO ADULTO:

Existe evidencia experimental que sugiere que la trombina puede interactuar con las células vía mecanismos diferentes a su receptor. Esta incluye la identificación de un dominio quimiotáctico (Arg-Gly-Asp), presente en la molécula de trombina (Bar-Shavit, 1992). Es importante mencionar que la interacción celular con esta región de la trombina, no requiere de la actividad enzimática de la molécula y está mediada, aparentemente, por sitios de unión diferentes al receptor. Cabe destacar el hecho de que el dominio Arg-Gly-Asp, está "escondido" en la estructura cristalina de la trombina, y se activa hasta que la trombina sufre una modificación estérica inducida por la plasmina durante los eventos de la cascada de la coagulación (Rabiet, 1994).

Los resultados obtenidos con el desarrollo de la presente tesis, muestran que la trombina es un factor quimiotáctico para los fibroblastos de pulmón humano adulto normal (CCD 16 Lu), utilizados para este trabajo. La concentración a la cual la trombina presentó un efecto sobre los fibroblastos fué de 1.25×10^{-11} M, ya que en esta dosis existió una mayor migración celular (ver gráfica 2). Cabe mencionar que dentro del sistema de migración *in vitro*, con el que se trabajó en esta tesis, seguramente existen moduladores positivos y negativos de la quimiotáxis, por lo que los efectos de la quimiotáxis que se evaluaron, son entonces el resultado del balance neto del efecto de estos moduladores sobre la migración celular de los fibroblastos.



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 de esta forma correlacionar la respuesta observada en otros fibroblastos como son los fibroblastos de piel de rata y humano fetal (Dawes, 1993).

IV. MECANISMOS DE QUIMIOTAXIS INDUCIDOS POR TROMBINA:

Existe evidencia experimental que sugiere, que la modulación fibroblástica inducida por los diferentes factores de crecimiento, es resultado de la interacción entre ellos. Por ejemplo, se sabe que la trombina induce la expresión 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), 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 a su vez puede, mediante el dímero BB inducir la expresión del TGF β .

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 conoce 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 trato de dilucidar la modulación fibroblástica a nivel de quimiotaxis 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 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, éste ha sido caracterizado como un potente quimioatrayente para fibroblastos (Osornio, 1990, Seppa, 1994) y del que además se sabe que cada forma estructural produce diferente efecto sobre la misma línea celular (Osornio, 1995). 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 1), observándose que la estimulación máxima (36 ± 3 células/10hpf) de la quimiotaxis fué inducida por la forma estructural BB a una concentración de 32 ng/ml.

Para cuantificar la contribución específica de la trombina y el PDGF a la migración fibroblástica, se emplearon inhibidores específicos para cada factor de crecimiento: para la trombina (hirudina y AT-III) y el anticuerpo neutralizante de la actividad biológica anti-PDGF para el PDGF.

Al observar el efecto que presentaron los inhibidores sobre la actividad de la trombina (ver gráficas 3 y 4) postulé, en primera instancia, que dicha actividad se debía tan sólo a la trombina, sin embargo, cuando el efecto de dicha proteasa de serina también se vio disminuido por el anticuerpo anti-PDGF (ver gráfica 5) concluí que dicha actividad está mediada no sólo por la trombina sino también por el PDGF, al menos en forma parcial.

Además de concluir que la actividad quimiotáctica de la trombina sobre fibroblastos de pulmón humano adulto estaba mediada por otro factor más, el PDGF, encontré que la forma de actuar de esta proteasa de serina, es probablemente modulando los receptores de dicho factor de crecimiento (ver gráfica 6). Ya que al ser estimuladas las células previamente con trombina a



tiempos de 24 y 48 horas, respondían al PDGF a una dosis menor (16 ng/ml), es posible que la estimulación previa con trombina disminuya el número de receptores para PDGF en los fibroblastos, lo que explicaría que se requiera una menor concentración de PDGF para poder inducir la migración celular. Es importante mencionar que aún a dosis muy bajas del anticuerpo neutralizante anti-PDGF la actividad quimioatrayente de la trombina se vió significativamente disminuida (ver gráfica 7) lo que sugiere importantemente que dicha actividad pudiera estar mediada por el factor de crecimiento PDGF.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES:

- Se determinó que la concentración de 0.14 % de gelatina es mejor que la de 0.07% para cubrir las membranas para quimiotaxis.
- El Factor Derivado de Plaquetas en su forma estructural BB (PDGF-BB) indujo *in vitro* una estimulación de la actividad quimiotáctica de los fibroblastos CCD-16 Lu, en forma dosis- dependiente. La dosis óptima de estimulación fué de 32 ng/ml.
- La α - Trombina indujo *in vitro* una estimulación de la actividad quimiotáctica de los fibroblastos CCD-16 Lu, en forma dosis- dependiente. La dosis óptima de estimulación fué de 1.25×10^{-11} M.
- Mediante el uso de inhibidores específicos de actividad biológica de la trombina (hirudina, AT-III), se determinó que la estimulación en la quimiotaxis fibroblástica, es atribuible a la acción de esta proteasa de serina.
- Mediante el uso de un inhibidor específico de la actividad biológica del PDGF (anti-PDGF), se determinó que la estimulación en la quimiotaxis de los



fibroblastos inducida por la trombina es mediada al menos en forma parcial, por el PDGF.

- Los resultados obtenidos sugieren que la trombina podría inducir un efecto modulador sobre los receptores del PDGF.
- Los resultados de actividad quimiotáctica inducida por trombina y PDGF, son resultado de una quimioatracción real, y no de un movimiento al azar (quimocinesis).



PERSPECTIVAS FUTURAS:

El tipo de respuesta biológica evaluado en la presente tesis (Quimiotáxis), podría ser mediada vía la actividad del receptor de trombina, el cual se sabe tienen siete 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, éste 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 proteína cinasa de tirosina (ligadas a receptores de factores de crecimiento como el PDGF) (Rabiet, 1994).

Aunque se conoce, lo antes mencionado sobre el receptor de trombina, todavía permanecen sin contestar preguntas tales 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? Mismas que sería interesante considerar para investigaciones posteriores.

Sobre el mecanismo de quimiotáxis inducido por la trombina, sería importante conocer:

¿Si la trombina es capaz de regular la síntesis del PDGF en el tiempo o solamente es capaz de liberarlo al medio? ¿Cómo es que la trombina está regulando el número de receptores para PDGF en la superficie celular? ¿Cómo interactúa con otros factores de crecimiento?

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA



- Avers J. C. *En: Cell Biology*. De D. Van Nostrand Company., New York. 1981. pp. 307-403.
- Avery, A., Said, S. Surface phenomena in lungs in health and disease. *Medicine*. 1966; 44; 503-526.
- Baffy, G., Yang L., Raj S., Mannings, D.R., Williamson J.R. G Protein coupling to the thrombin receptor in chinese hamster lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1994; 269; 8483-8487.
- Bar-Shavit, R., Benezra M., Sabbah V., Bode W., Vlodayvsky I. 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, V. Lampugnani, M.G., Marchisio, P.C., Fenton, J.W.II, Vlodayvsky, Y., dejana, E. An Arg-Gly-Asp-sequence within thrombin promotes endothelial cell adhesion. *J. Cell Biol.* 1991; 112; 335-342.
- Bar-Shavit, R., Benezra M., Sabbah V., Dejana E., Vlodayvsky Y., Wilner G.D., Functional domains in thrombin outside the catalytic site: cellular interactions. *En: Berliner I.J. Thrombin: structure and function*. New York. Plenum Press. 1992; pp 315-350.
- Baserga, R.Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell.* 1994; 79; 927-930.
- Battergay, E.j., Raines, E.W., Sifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., Ross, R. TGF β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of autocrine PDGF loop.*Cell.* 1990; 179;23-130.
- Baum, B.J., Moss, J., Breul, S.D., Berg, R.A., Crystal, R.G. Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized collagen. *J. Biol. Chem.* 1980; 255; 2843-2847.
- Benezra, M., Vlodayvsky, Y. Isha-Michaeli, R., Neufeld, G. Bar-Shavit, R. Thrombin-induce release of active basic fibroblast growth factor heparan sulphate complexes subendothelial extracellular matrix. *Blood.* 1993; 81; 3324-3331.
- Berkalof, A., Bourquet, J., Favard, P., Lacroix, C. *En: Biología y fisiología celular*. vol.III. Omega, México.1986. pp.113-169.
- Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Adelberg, S., Crystal, R.G. Role of fibronectin as a growth factor for fibroblast. *J. Cell.Biol.* 1983; 97; 1925-1932.
- Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Adelberg, S., Crystal, R.G. Mechanisms of pulmonary fibrosis: spontaneous release of alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. *J. Clin. Invest.* 1983; 72; 1801-1813.
- Bonner, J.C., Osornio-Vargas A.R., Brody A.R. Differential proliferation of rat lung fibroblasts induced by the platelet-derived growth factor-AA,-AB,-BB isoforms secreted by rat alveolar macrophages. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1991; 5; 539-547.
- Bonner, J.C., Badgett, A., Osornio-Vargas, A.R, Hoffman M., Brody A.R. PDGF-Stimulate fibroblast proliferation is enhanced synergistically by receptor-recognized α 2- macroglobulin. *J. Cell. Physiol.* 1990; 145, 1-8.
- Bonner, J.C., Goodell, A.L., Coin, P.G., Brody, A.R. Chrysotile asbestos up regulates gene expression and production of alpha-receptors for platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. *J.Clin. Invest.* 1993; 92; 425-430.



Brass, L.F., Ahuja, M., Belmonte, E., et al. Thrombin receptors: turning them off after turning them on. *Sem. Hematol.* 1994; 31 (3); 251-260.

Brezniak, D.V., M.S. Brower, J.I. Witting, D.A. Walz, J.W. Fenton II. Human α - to ζ -Thrombin cleavage occurs with neutrophil cathepsin G or chymotrypsin while fibrinogen clotting activity is retained. *Biochemistry.* 1990. 29: 3536-3542.

Cambrey, A.D., Mc Anulty, R.J., Harrison, N.K., Dawes, K.E., Campa, J.S., duBois, R.M., Black C.M., Laurent, G.J. Endothelin is present in the lungs of patients with systemic sclerosis and stimulates lung fibroblast replication in vitro. *Thorax.* In press 1995.

Clark, R.A.F., Folkvord, J.M., Hart, C.E, Murray, M.J., McPherson, J.M. Platelet-derived growth factor isoforms stimulates fibroblasts to contract collagen matrices. *J.Clin. Invest.* 1989; 84; 1036-1040.

Cockayne, D., Sterling, K.M., Shull, S., Mintz, K.P., Ileyne, S., Cutroneo, K.R. Glucocorticoids decrease the synthesis of type Y procollagen mRNAs. *Biochemistry.* 1986; 25; 3202-3209.

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

Crouch, E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *American Physiological Society.* 1990: 159-184.

Crystal, R.G., Ferrans, V.J., Basset, F. Biologic Basis of Pulmonary Fibrosis. *The lung.* 1991: 2031-2045.

Dawes, K.E., Gray, A.J., Laurent, G.J. Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication. *Eur.J.Cell Biol.* 1993; 61; 126-130.

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.

DiCorleto, P.E., Bowen-Pope, D.F., Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80; 1919-1923.

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

Falk, G.L. A 48 Well Micro Chemotaxis Assembly for Rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immun. Methods.* 1980; 33; 239-247.

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

Fenton II, J.W., Villanueva, G.B., Ofosu, F.A., Maraganore, J.M. Thrombin Inhibition by Hirudin: How Hirudin inhibits thrombin. *Haemostasis.* 1991; 21 (S. 1); 27-31.

Fenton II, J.W., Ofosu, F.A., Brezniak, D.V., Hassouna, H.I. Understanding Thrombin and hemostasis. *Coagulation disorders II.* 1993; 7; 1107-1119.

Franke, Th., Yang, F., S-II, Chan, T.O., et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-actived phosphatidilinositol-3kinase. *Cell.* 1995; 81; 727-736.



- Freshney, N.W., Rawlinson, A., Guedson, F. et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*. 1994; 78; 1039-1049.
- Gauldie, J., Jordana, M., Cox, G., Gay, R.E. Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor and sis-oncogene expression in scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 92; 301-303.
- Goldstein, R.H., Poliks, C.F., Pilch, P.F. Smith, B.D., Fine, A. Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human foetal lung fibroblasts. *Endocrinology*. 1989; 124; 964-970.
- Gray, A.J., Reeves, J.T., Harrison, N.K., Winlove, P., Laurent, G.J. Growth factors for human fibroblasts in the solute remaining after clot formation. *J. Cell Sci.* 1990; 96; 271-274.
- Harlan, M.J., Thomson, P.J., Ross, R., Bowen-Pope D.F. α -Thrombin induces release platelet derived growth factor-like molecule (s) by cultures human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1986; 103; 1129-1133.
- Heath, J.P., Holifield, B.F..1991. Cell locomotion: new research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow. *Cell Motility Cytoskeleton*. 18:245-257.
- Heldin, C.H., Westermark, B.W. Structure of Platelet-Derived Growth Factor: Implications for functional properties. *Growth Factors*. 1993; 8; 245-252.
- Hernández-Rodríguez, N.A., Cambrey, A.D., McAnulty, R.J., Chambers, R.C., duBois, R.M., Black, C.M., Sculli, M.F., Laurent, G.J. Evidence that thrombin acts as a fibroblast growth factor in pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis. *Am. J. respir. Crit. care Med.* 1994; 149; A709.
- Hernández-Rodríguez, N.A., Cambrey, A.D., Harrison, N.K., Chambers, R.C., Gray, A.J., Southcott, A.M., duBois, R.M., Black, C.M., Sculli, M.F., McAnulty, R.J., Laurent, G.J. Thrombin contributes to fibroblast mitogenic activity in the lungs 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.
- Jiménez, S.A., Freundlich, B., Rosenbloom, J. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. *J. Clin. Invest.* 1984; 74; 1112-1116.
- Kahari, V.M., Multimäki, P., Vuorio, E. Elevated pro- α 2(1) collagen mRNA levels in cultured scleroderma fibroblasts results from an increased transcription rate of the corresponding gene. *FEBS. Lett.* 1987; 215; 331-334.
- Kelley, J. Cytokines of the lung. *Am Rev. respir. Dis.* 1990; 141; 765-788.
- Kettner, C., Shaw, E. D-PHE-PRO-ARGCH₂Cl-A selective affinity label for thrombin. *Thrombosis Research*. 1979; 14; 969-973.
- Kirk, J.M.E., Heard, B.E., Kerr, Y., Turner-Waewick, M., Littlejohn, R.J., Laurent, G.J. Biochemical evidence for an increased and progressive deposition of collagen in the lungs of patients with pulmonary fibrosis. *Clin. Sci.* 1986; 70; 39-45.
- Kivirikko, K. Collagen and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann. Med.* 1993; 25; 113-126.



- Koshland, D. Mitosis: Back to the basis. *Cell*. 1994; 77; 273-283.
- Kovacs, E.J., Kelley, J. Lymphokine regulation of macrofage-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 I collagen genes and production of type I collagen in cultured skin fibroblasts in the presence or absence of L-ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *J. Biol. Chem.* 1991; 266; 9997-10003.
- Laurent, G.J., McAnulty, R.J., Corrin B., Cocherill, P. Biochemical and histological changes in pulmonary fibrosis induced in rabbits with intratracheal bleomycin. *Eur. J. Clin. Invest.* 1981; 11; 441-448.
- Laurent, G.J., Rates of collagen synthesis in the lung, skin, and muscle obtained *in vivo* by a simplified method using (^3H)proline. *Biochem. J.* 1982; 206; 535-544.
- Laurent, G.J., Bishop, J.E., Gray, A.J., Peacock, A., Harrison, N.K., Winlove, C.P., Lever, M.J., Reves, J.T. Deposition of arterial collagen in pulmonary hypertension. Putative role for growth factors derived from the circulation. En: progress in respiration Research. Eds. Herget J. and Widimisky J. Basel Switzerland. 1990; 26; 54-62.
- Leof, E.B., Proper, J.A., Goustin, A.S., Shipley, G.D., DiCorleto, P.E., Moses, H.L. Induction of c-sis mRNA and activity to similar platelet-derived growth factor by transforming growth factor β : a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83; 2453-2457.
- Mann, K.G., Lundblas, R.L. Biochemistry of thrombin. En: Hemostasis and thrombosis. Basic Principles and clinical practice. 2nd Edition. Colman R.W., Hirsh J., Marcler W.J., Salzman E., J.B. Lippincott company. USA Philadelphia Pennsylvania. 1987. pp. 148-159.
- Martinet, Y., Bitterman, P.B., Mornex, J.F., Grotendorst, G.R., Martin, G.R., Crystal, R.G. Activated human monocytes express the c-sis proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. *Nature*. 1986; 319; 158-160.
- Martinet, Y., Rom, W.N., Grotendorst, G.R., Martin, G.R., Crystal, R.G. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Eng. J. Med.* 1987; 317; 202-209.
- Mauviel, A., Redini, F., Hartmann, D.J., Pujol, J.P., Evans, C.H. Modulation of human dermal fibroblast extracellular matrix metabolism by the lymphokine leukoregulin. *J. Cell. Biol.* 1991; 113; 1455-1462.
- Mays, P.K., McAnulty, R.J., Laurent G.J. Age-related changes in lung collagen metabolism: a role for degradation in regulating lung collagen production. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 140; 410-416.
- McAnulty, R.J., Laurent, G.J. Collagen synthesis and degradation *in vivo*. Evidence for rapid rates of collagen turnover with extensive degradation of newly synthesized collagen in tissues of adult rat lung. *Collagen Rel. Res.* 1987; 7; 93-104.
- McAnulty, R.J., Campa, J.S., Cambrey, A.D., Laurent, G.J. The effect of transforming growth factor β on rates of procollagen synthesis and degradation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1991; 1091; 231-235.



McAnulty, R.J., Laurent, G.J. Collagen and its regulation in pulmonary fibrosis. *Thorax*. 1995. EN PRENSA.

McCoy, B.J., Diegelmann, R.F., Cohen, I.K. *In vitro* inhibition of cell growth, collagen synthesis, and prolyl hydroxylase activity by triamcinolone acetonide (40750) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1980; 163: 2166-2172.

McNamara, C.A., Sarembok, I.J., Gimple, L.W., Fenton II, J.W., Coughlin, S.R., Owens, G.K. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J.Clin.Inves.* 1993; 91: 94-98.

Meyer, P. En: *Fisiología Humana*. Editorial Salvat. España. 1985. pp. 797-800.

Miller, E.J., Gay, S. Collagen structure and function. En: *Wound healing: Biochemical and clinical aspects*, edited by Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J.W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. 1992. pp 130-151.

Murray, a. Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biol.* 1991; 6: 872-876.

Nierodzic, M.L.R., Kajumo F., Karpatkin S. Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cell to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res.* 1992; 52: 3267-3272.

Nurden P., Heilmann E., Paponneau A., Nurden A. Two-way trafficking of membrane glycoproteins on thrombin-activated human platelets. *Sem. Hematol.* 1994; 31 (3):240-250.

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

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

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

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

Osornio-Vargas, A.R., Bonner J.C., Badgett A, Brody A.R. Rat alveolar macrophages-derived Platelet-derived growth factor is chemotactic for rat lung fibroblasts. *Am.J. Respir. Cell Mol.Biol.* 1990; 3: 595-602.

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

Osornio-Vargas, A.R., Goodell A.L, Hernández-Rodríguez N.A., Brody A.R., Coin P.G., Badgett A., Bonner J.C. Platelet-derived growth factor (PDGF)- AA, -AB, -BB induce differential chemotaxis of early-passage rat lung fibroblasts in vitro. *Am.J.Respir. Cell mol.Biol.* 1995; 12: 33-40.



- Overall, C.M., Wrana, J.L., Sodek, J. Independent regulation of collagenase, 72-Kda progelatinase and metalloproteinase inhibitor expression in human fibroblast by transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* 1989; 264; 1860-1869.
- Peacock, A.J., dawes, K.E., Sock, A., Gray, A.J., Reeves, J.T., Laurent, G.J. Endothelin-1 and endothelin-3 induce Chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992; 7; 492-499.
- Peppelenbusch, M.P., Qui, R.G., de Vries-Smits, A.M., et al. Rac mediates growth factor-induced arachidonic acid release. *Cell.* 1995; 81; 849-856.
- Phillips, P.D., Pignolo, R.J., Christofalo, V.J. Insulin-like growth factor-1: specific binding to high and low affinity sites and mitogenic action throughout the life span of WI.38 cells. *J. Cell Physiol.* 1987; 133, 135-143.
- Pierce, F.G., Mustoe T.A., Altmock B.W., Deuel T.F., Thomason A. Role of Platelet-derived growth factor in wound healing. *J.Cell. Biochem.* 1991; 45; 319-326.
- Postlethwaite, A.E., Snyderman, R., Kang, H.A. The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor. *J.Exp.Med.* 1976; 144; 1188-1202.
- Postlethwaite, A.E.; Seyer, J.M., Kang, H.A. The chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, III, collagens an collagen-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978; 75; 871-876.
- Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Balian, G., Kang H.A. Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. Localization of the chemotactic region to a 140,000 molecular weigh non-gelatin binding fragment. *J.Exp.Med.* 1981; 153; 494-499.
- Postlethwaite, A.E., Snyderman, R., Kang, H.A. Generation of fibroblast chemoattracting factor in the serum by activation of complement. *J. Clin. Invest.* 1984; 82; 9-13.
- Postlethwaite, A.E., Keski-Oja J., Moses, H.L., Kang H.A. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblast by TGF β . *Exp. Med.* 1987; 165; 251-256.
- Potts, J.R., Campbell, L.D. Fibronectin structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biol.* 1994; 6; 648-655.
- Preston, T.M., King, C.A., Hyams, J.S. Crawling Movements. *En: The cytoskeleton and cell motility.* Blackie. USA. 1990. pp 141-157.
- Prockop, D.J., Kivirikko, K. Collagens. Molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Ann. Rev Biochem.* 1995; 64; 403-434.
- Rabiet M.J., Plantier J.L., Dejana E. Thrombin-induced endothelial cell dysfunction. *Brimed Bolletín.* 1994; 50 (4); 936-945.
- Reiser, K.M., Last, J.A. Pulmonary fibrosis in experimental acute respiratory disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1981; 123; 58-63.
- Richards, R.J., Masek, L.C., Brown, R.F. Biochemical and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Toxicol. Pathol.* 1991; 19; 526-539.
- Roberts, H.R., J.N. Lozier. Nuevas perspectivas sobre la cascada de coagulación. *Hospital Practice.* 1994; 2; 150-160.



- Rosenberg, R. The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. Chapter 91. Hemostasis and thrombosis. Basic Principles and clinical practice. 2nd Edition. Colman R.W., Hirsh J., Marcler W.J., Salzman E., J.B. Lippincott company. USA Philadelphia Pennsylvania. 1987. 1373-1385.
- Ross, R., Raines, E.W., Bowen-Pope, D.F. The biology of Platelet-derived growth factor. *Cell*. 1986; 46: 145-169.
- Ross R. Platelet-derived growth factor. *Ann.Rev.Med.* 1987; 38; 71-79.
- Ross, R., Raines, E.W., Bowen-Pope, D.F. The biology of platelet-derived factor and its role in health and disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1990; B327; 155-169.
- Ruggeri, Z.M. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Sem. Hematol.* 1994; 31 (3); 229-239.
- Saltzman, L.E., Moss, J., Berg, R.A., Honi, B., Crystal, R.G. Modulation of collagen production by fibroblast: Effect of chronic exposure to agonists that increases intracellular cyclic AMP. *Biochem. J.* 1982; 204; 25-30.
- Seifert, R.A., S.A. Coats, E.W. Raines, R. Ross, and D.F. Bowen-Pope. Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor α -subunit mutant and reconstituted cell lines demonstrate that transforming growth factor- β can be mitogenic through PDGF α -chain-dependent and independent pathways. *J.Biol.Chem.* 1994. 269 :13951-13955.
- Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S., Schiffman, E.J., Martin, G.R. Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 1982; 92; 584-588.
- Seyer, J.M., Hutcheson, E.T., Kang A.H. Collagen polymorphism in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1976; 57; 1489-1507.
- Shaw, L.M., Olsen, B.R. FACIT Collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *TIBS.* 1991; 16; 191-194.
- Shimokado, K., Raines, E.W., Madtes, D.K., Barrett, T.B., Benditt, E.P., Ross, R. A significant part of Macrophages-derived growth factor consists of a least two forms of PDGF. *Cell*. 1985; 43; 277-286.
- Siegbahn, A., Hammacher, A., Westermark, B., Heldin, C.H. Differential effects of the various isoforms of Platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J.Clin.Invest.* 1990; 85; 916-920.
- 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.
- Snyderman, R. Chemotaxis of human and murine mononuclear phagocytes. En: Adams, D.O., Edelson, P.J., Karen, H.S. Methods for studing mononuclear phagocytes. Academic Press New York. 1981. pp. 39-50.
- Soma, Y., Takehara K., Ishibashi Y. Alteration of the chemotactic response of human skin fibroblasts to PDGF by growth factors. *Exp.Cell Research.* 1994; 212; 274-277.



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

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

Van der Rest, M., Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB. J.* 1991; 5: 2814-2823.

Varga, J., Jimenez, S.A. Stimulation of normal human fibroblasts collagen production and processing by transforming growth factor- β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; 138: 974-980.

Vilcek, J., Palombella, V.J., Henriksen-DeStefano, D., Swenson, C., Feinman, R., Hiari, M., Tsujimoto, M. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J. Exp. Med.* 1986; 632-643.

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

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

Walker, L.N., Bowen-Pope, D.F., Ross, R., Reidy, M.A. Production of platelet-derived growth factor-like molecule by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 7311-7315.

Wennström, S., Sieghahn, A., Yokote, K., Arvidsson, A.K., Heldin, C.H., Mori, S., Claesson-Welsh, L. Membrane ruffling and chemotaxis transduced by the PDGF β -receptor require the binding site for phosphatidylinositol 3'kinase. *Oncogene.* 1994; 9: 651-660.

Westermarck B., L. Claesson-Welsh, C.H. Heldin. Structural and functional aspects of platelet-derived growth factor and its receptors. Proto-oncogenes in cell development. Wiley, Chichester. *En: Molecular Cell Biology.* 1990. Second Edition. Chapter 23. pp. 6-22.

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

Williams, J.W. Biochemistry of plasma coagulation factors. Chapter: 132. *En: Hematology.*

Williams, J.W. life-span of plasma coagulation factors. Chapter: 134 *En: Hematology.*

Williams, J.W. Mechanism of coagulation. Chapter: 135. *En: Hematology.*

Williams, J.W. Control of coagulation reactions. Chapter: 136. *En: Hematology.*

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA