

11262

15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SEDE CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

INFLAMACION MEDIADA POR NEUTROFILOS: ESTUDIO
SOBRE LA CONTRIBUCION DE LA TSP1 UNIDA A LA
MEMBRANA CELULAR EN LA REGULACION DE LOS
SISTEMAS DE COAGULACION, FIBRINOLISIS Y ADHESION
CELULAR EN UN MODELO CON CELULAS HL-60.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
IRMA ISORDIA SALAS

TUTOR: DOCTOR ABRAHAM MAJLUF CRUZ
UNIDAD DE INVESTIGACION EN EPIDEMIOLOGIA CLINICA
HOSPITAL GENERAL REGIONAL GABRIEL MANCERA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

COTUTOR: DOCTOR RAUL ALVAREZ DE LA CADENA
ASSISTANT PROFESSOR. DEPARTMENT OF PATHOLOGY AND
LABORATORY MEDICINE
TEMPLE UNIVERSITY, PHILADELPHIA, PA.



2001 289606



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.

ÍNDICE.

Resumen.....	3
Abstract.....	4
Antecedentes.....	5
Justificación.....	13
Planteamiento del problema.....	14
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	16
Material y métodos.....	17
Resultados.....	26
Discusión.....	36
Conclusiones.....	41
Bibliografía	43

RESUMEN.

INTRODUCCIÓN. La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo. Está presente en varios procesos fisiológicos y fisiopatológicos. El neutrófilo (PMN) es importante en este proceso. El reclutamiento de leucocitos es esencial para una inflamación adecuada. EL PMN posee gránulos que almacenan proteinasas liberadas en la activación celular. Estas enzimas causan daño tisular en diversas patologías.

La trombospondina (TSP) es una proteína extracelular que modula la adhesión de algunas células, su proliferación y diferenciación. Se sintetiza en el endotelio, epitelio, monocitos, macrófagos y PMNs. Es una proteína globular compuesta por un dominio N-terminal (pm=30kDa), seguido por repeticiones tipo I, II y III unidas a una región globular grande C-terminal que une TSP a células o a otras proteínas.

Las células HL-60 son una línea promielocítica humana maligna que se diferencia en diversas células mieloides. Se diferencian hasta PMNs mediante ácido all-trans retinoico (ATRA). En este estudio, llevamos a cabo pruebas de coagulación y fibrinólisis utilizando células HL-60 diferenciadas o indiferenciadas.

PLANTEAMIENTO GENERAL. ¿Cuál es el efecto de la TSP en las células HL-60 inducidas a la maduración mediante ATRA sobre la actividad de la EN expresada también sobre la membrana de estas células?

HIPÓTESIS GENERAL. El aumento en la unión de TSP a la membrana de las células HL-60 inducidas a la maduración mediante ATRA, disminuye la actividad de la EN sobre la membrana de estas células.

OBJETIVO GENERAL. Mediante la maduración de las células HL-60 inducida mediante el ATRA, determinar el efecto regulador de la TSP sobre la actividad de la EN sobre la membrana de estas células.

MATERIAL Y METODOS.

Este experimento biomédico básico incluyó cultivos celulares (viabilidad celular >98%, diferenciación hasta PMNs >90%). La variable independiente fue el tratamiento con ATRA y las dependientes fueron las reacciones de coagulación, la fibrinólisis dependiente de células y la actividad de EN en la membrana de las HL-60. Para determinar el efecto de la TSP sobre las HL-60, utilizamos pruebas cromogénicas para las enzimas generadas. De acuerdo al experimento, agregamos TSP, complejos enzimáticos, factores hemostáticos o fibrinolíticos, otras enzimas, inhibidores enzimáticos, etc. Para la activación celular se utilizó fMLP. Los experimentos se leyeron por la concentración del sustrato cromogénico liberado en cada reacción. Para establecer la presencia de FV o plasminógeno y su ruptura enzimática, se realizó Western Blot.

RESULTADOS PRINCIPALES.

1. Las HL-60 tienen actividad de EN que disminuye cuando maduran con ATRA. La EN de las HL-60 diferenciadas o no aumenta cuando las células son activadas. La EN de las HL-60 diferenciadas o no disminuye cuando las células se incuban con TSP. 2. La EN de las HL-60 activa al FV y forma protrombina y trombina. La maduración de las HL-60 disminuye la activación de FV y la formación de protrombina y trombina. La activación de HL-60 incrementa la activación de FV y la formación de protrombina y trombina. La TSP disminuye la activación de FV y la formación de protrombina y trombina al modular la EN. La modulación de EN no depende completamente de TSP. Un anticuerpo anti-TSP aumenta la activación del FV y la formación de protrombina y trombina. 3. Las células HL-60 diferenciadas con ATRA poseen FV en su interior. 4. La EN de las HL-60 activa al plasminógeno, se forma plasmina y se activa la fibrinólisis. La diferenciación de las HL-60 disminuye la activación del plasminógeno, la formación de plasmina y la activación fibrinolítica. La activación de las HL-60 diferenciadas o no, incrementa la activación del plasminógeno, la formación de plasmina y la activación fibrinolítica. La adición de TSP disminuye la activación del plasminógeno y la formación de plasmina. Un anticuerpo anti-TSP inhibe la actividad de la TSP sobre la EN y aumenta la activación del plasminógeno, la formación de plasmina y la activación fibrinolítica.

CONCLUSIONES.

1. Las HL-60 expresan EN en su membrana que disminuye cuando la célula madura con ATRA quizá por aumento en la unión de TSP a la membrana. La EN disminuye si las HL-60 son preincubadas con TSP. 2. La modulación de la EN en la membrana de las HL-60 no es total, aún si son preincubadas con TSP. Por lo tanto, la modulación de la EN por TSP en la membrana es eficiente pero incompleta. 3. Mediante un activador para PMNs se indujo la expresión máxima de EN y TSP de las HL-60. Aunque el comportamiento de la EN fue similar al de las células no activadas, el incremento en la EN fue mayor indicando que la activación celular permite la expresión máxima de EN y TSP en la membrana. 4. La EN en la superficie de las HL-60 activa al FV y genera trombina. La actividad del FV es similar a la actividad de EN; disminuye con la maduración por ATRA, preincubando con TSP o con un inhibidor de EN. Sin embargo, la activación del FV aumenta con la activación celular y con un anticuerpo monoclonal anti-TSP. Así, aumentar la modulación de TSP aumenta la regulación de EN y viceversa. 5. Las HL-60 contienen FV. Este factor se activa y se comporta de manera similar al exógeno cuando las células maduran, se activan, se incuban con TSP o sus inhibidores y con el inhibidor de la EN. 6. Los estudios de fibrinólisis mostraron que la EN activa al plasminógeno directamente dependiendo de la activación celular. La fibrinólisis disminuye significativamente con la maduración celular, la incubación con TSP o con un inhibidor de EN. La EN es importante en la activación de la coagulación.

ABSTRACT.

INTRODUCTION. Inflammatory response is one of the main defense mechanisms. It is present in several process both physiological and physiopathological. Neutrophil (PMN), plays a key role in this process. Leukocyte recruitment is crucial to establish an appropriate inflammatory response. PMN has several kinds of granules which storage proteinases to be released upon cellular activation. These enzymes can also induce tissue damage in several diseases.

Thrombospondin (TSP), is an extracellular protein that modulates adhesion of some cells as well as their proliferation and differentiation. TSP is synthesized in endothelial and epithelial cells, monocytes, macrophages, and PMNs. TSP is a globular protein with a N-terminal domain (pm=30kDa), followed by type I, II and III repetitions in contact with a large C- terminal globular domain that binds cells or other proteins.

HL-60 cells is a malignant promyelocytic cell line which ca be differentiated to several myeloid committed cell lines. Their differentiation up to PMNs is possible with all-trans retinoic acid (ATRA). In this study, we performed coagulation and fibrinolytic assays using these differentiated or undifferentiated HL-60 cells.

GENERAL APPROACH. ¿What is the effect of TSP on the membrane of HL-60 cells induced to differentiation with ATRA upon NE activity expressed also on the membrane of these cells?

GENERAL HYPOTHESIS. Rising the binding of TSP to the membrane of HL-60 cells induced to differentiation with ATRA, diminishes NE activity on the membrane of these cells.

GENERAL OBJECTIVE. Through differentiation of HL-60 cells induced by ATRA, to determine the regulatory effect of TSP on NE activity localized on the cell membrane of these cells.

MATERIAL Y METHODS. This study is a basic biomedical experiment which included cell cultures (cell viability > 98%, at least > 90% PMN differentiation). Independent variable was cells treatment with ATRA while dependent variables were blood coagulation reactions, fibrinolytic activity, and the spontaneous NE activity. In order to determine the effect of TSP bound to HL-60 cells, we performed chromogenic assays for the enzymes generated. According to the nature of the experiment, purified TSP, enzymatic complexes or hemostatic or fibrinolytic factors, were added. In order to activate the cells, fMLP was added. Readings were done based on the concentration of the chromogenic substrate released in each reaction. To establish the presence of FV or plasminogen in the cell supernatant and its enzymatic cleavage, a Western Blot was performed.

MAIN RESULTS.

1. HL-60 cells express NE activity but this activity diminishes after cell differentiation with ATRA. NE activity in differentiated or undifferentiated HL-60 cells rises after cell activation. NE activity in both differentiated and undifferentiated HL-60 cells diminishes after cell incubation in the presence of TSP. 2. NE on HL-60 cells activates FV, forming a prothrombinase complex and thrombin. Differentiation of HL-60 cells drops all these parameters. Activation of HL-60 cells rises activation of FV and the expression of prothrombinase complex and thrombin. Addition of TSP diminishes FV activation and the consequent prothrombinase complex and thrombin. Modulation of NE does not totally depends on TSP. A anti-TSP antibody rises FV activation and prothrombin complex and thrombin expression. 3. Differentiated HL-60 cells have FV in their cytosol. 4. NE of HL-60 cells activates plasminogen, plasmin is formed and a activation of fibrinolysis occurs. HL-60 differentiation drops plasminogen activation, plasmin formation, and fibrinolysis activation. Activation of differentiated or undifferentiated HL-60 cells increments activation of plasminogen, generation of plasmin, and fibrinolysis. Addition of TSP, diminishes all these variables due to a modulatory effect on NE activity. A anti-TSP antibody rises plasminogen activation, plasmin generation and fibrinolysis activation.

CONCLUSIONS.

1. HL-60 cells express NE activity on their membrane. This activity drops after cell differentiation as a consequence of a rise in TSP binding to the cell membrane. Furthermore, NE activity diminishes if HL-60 cells are preincubated with TSP. 2. Modulation of the NE activity on HL-60 cells is not complete, even if the cells are preincubated with TSP. Therefore, modulation of NE activity by TSP on the cell membrane is efficient but incomplete. 3. Using a specific PMNs activator, a maximal expression of NE and TSP was induced on the HL-60 cells. The pattern of NE activity was similar to that found in unactivated cells but the increment in NE activity was higher indicating that cell activation allows the maximal expression of NE and TSP on the membrane. 4. NE activity on HL-60 cells activates FV generating thrombin. FV activation is similar to NE activation pattern in the system: it drops after cell differentiation, after incubation with TSP, and in the presence of a NE inhibitor. However, FV activation rises with cell activation and in the presence of a anti-TSP antibody. Therefore, every rise in TSP modulatory activity has a subsequent increment in the regulatory effect on NE activity and vice versa. 5. HL-60 cells contain FV. FV is activated and has a pattern of activity resembling the exogenous FV after cell differentiation or after incubation with TSP and its inhibitors and with a NE inhibitor. 6. Results of fibrinolysis assays shown that NE activates plasminogen directly depending on cell activation. Fibrinolysis significantly diminishes after cell differentiation, TSP incubation or in the presence of a specific NE inhibitor. NE has an important role in the activation of blood coagulation in a cell model that resembles the inflammatory system.

ANTECEDENTES.

La respuesta inflamatoria es uno de los principales mecanismos de defensa del organismo (1). La inflamación representa el punto de convergencia de numerosos procesos fisiológicos (coagulación, respuesta hemodinámica cardiovascular e inmunidad)(2,3), y fisiopatológicos (autoinmunidad, sepsis, aterogénesis, fenómeno isquemia reperfusión, coagulación intravascular diseminada, etc.)(4,5). Los estudios iniciales acerca de la respuesta inflamatoria fueron realizados desde 1889 por Conheim, quien describió que el elemento responsable de dicho proceso era el endotelio(6). Desde entonces, el fenómeno ha sido motivo de extensas investigaciones. Posteriormente, se demostró la existencia de otros elementos de participación activa, los cuales, fueron ya descritos en 1894 cuando se concibió al fenómeno inflamatorio como resultado de la interacción entre endotelio y células, siendo éstas principalmente plaquetas y leucocitos(7).

El fenómeno inflamatorio tiene diversos componentes. Uno muy importante es el celular por su capacidad de amplificación y mantenimiento de la reacción(8). Los detalles precisos por los cuales la célula interactúa con la superficie endotelial y migra desde la sangre, son motivo de investigación desde hace mucho tiempo. Hoy sabemos que la célula más importante es el neutrófilo (PMN), debido a su gran capacidad proteolítica la cual depende de las enzimas contenidas en sus gránulos, de sus características adhesivas y migratorias (lo que le permite entrar y abandonar fácilmente el sitio de reacción inflamatoria), y de capacidad para unirse e interactuar con plaquetas, linfocitos y células endoteliales. Estos dos últimos efectos permiten al PMN modular la función de estas últimas células(8).

El proceso de migración leucocitaria ha sido ampliamente estudiado en los últimos años(9). En la actualidad se describe como una cascada de eventos que permiten al leucocito llegar al sitio de inflamación. Los pasos de esta cascada fisiopatológica son la activación, el

rodamiento leucocito- endotelio, la adhesión al endotelio y la migración transendotelial(10,11). La activación ocurre por el concurso de diversas moléculas incluyendo factores de crecimiento, citocinas, leucotrieno B4, factor activador de plaquetas, factor de necrosis tumoral y quimioatrayentes que son liberados en el sitio de lesión vascular o de daño tisular y que facilitan el reclutamiento de monocitos y PMNs desde la circulación, promoviendo la adhesión y/o migración del PMN(12,13). Existe evidencia que indica que las proteínas de la matriz extracelular (MEC), son muy importantes en este proceso(14). Se sabe que los monocitos y PMNs se acumulan en áreas de gran concentración de proteínas de la MEC y que estas proteínas potencializan y promueven la fagocitosis(15).

Existe una interacción fisiológica continua entre los PMNs y la pared vascular. A este nivel, aproximadamente, un 10% del total de los PMNs que se encuentran en reserva, migra cada hora desde la corriente sanguínea hacia el espacio extravascular mediante adherencia y diapédesis a través del endotelio(16). Por otra parte, también existe una interacción dinámica entre endotelio y PMNs en la reserva marginal no circulante. Esta reserva puede ser movilizada rápidamente hacia la reserva circulante mediante un estímulo efectivo como puede ser el ejercicio o la epinefrina. Se ha demostrado que, en condiciones fisiológicas, los PMNs parecen rodar a lo largo del vaso sanguíneo en una corriente marginal pero que en algunas ocasiones quedan firmemente adheridos para lo cual se requiere la expresión de una serie de moléculas de adhesión altamente específicas y de sus ligandos respectivos(17). Las interacciones fisiológicas entre el PMN circulante y el endotelio vascular se alteran dramáticamente durante la inflamación aguda existiendo un incremento en la adhesión del leucocito a la pared endotelial. Esto modifica el balance hemostático ya que se activa la coagulación dependiente de leucocitos como se ha demostrado en varios procesos inmunoinflamatorios(18).

Los leucocitos tienen un papel crucial en el inicio y progresión de las enfermedades vasculares(19). Este proceso tiene la marca de una respuesta inflamatoria local, caracterizada por un incremento de la adhesión al endotelio con liberación temprana de citocinas inflamatorias. El evento culmina con la migración transendotelial del leucocito y su acumulación en la capa íntima de vaso(20).

Como se mencionó antes, existen diversos procesos fisiopatológicos en los que confluyen los procesos de inflamación, coagulación y fibrinólisis debido al contenido enzimático del PMN. La coagulación dependiente del leucocito puede contribuir directamente en la fisiopatología de la respuesta inflamatoria. Este fenómeno ha sido estudiado por más de dos décadas desde las observaciones de Colvin sobre el papel del depósito de fibrina en la respuesta inmunitaria(21). El PMN inactivo contiene en sus gránulos diversas enzimas proteolíticas entre ellas elastasa del neutrófilo (EN), catepsina G, catalasa y activadores del plasminógeno las cuales, en conjunto con los radicales liberados del PMN activado, tienen un papel importante no sólo en la limitación de la infección bacteriana, sino también en la destrucción tisular característica de algunas enfermedades como enfisema pulmonar, síndrome de distrés respiratorio del adulto y artritis reumatoide(22,23).

En condiciones normales la EN se produce y almacena en el PMN. Sin embargo, después de la activación de esta célula, la EN aparece libre en el plasma(24). Luego de activarse, el contenido de los gránulos del PMN se vierte al medio externo o queda unido a la membrana de la misma célula, sitio donde estas enzimas realizan la mayor parte de sus funciones. La EN es una enzima de gran capacidad proteolítica que actúa sobre múltiples substratos proteicos incluyendo algunos factores de la coagulación como el factor von Willebrand, factor V, fibrinógeno y plasminógeno(25). Esta activación indirecta del sistema hemostático permite la aparición de una coagulopatía y/o fibrinólisis de diversa intensidad que se asocia con la

mayoría de los estados fisiopatológicos en los que existe inflamación y activación extensa del PMN(26) (Fig. 1).

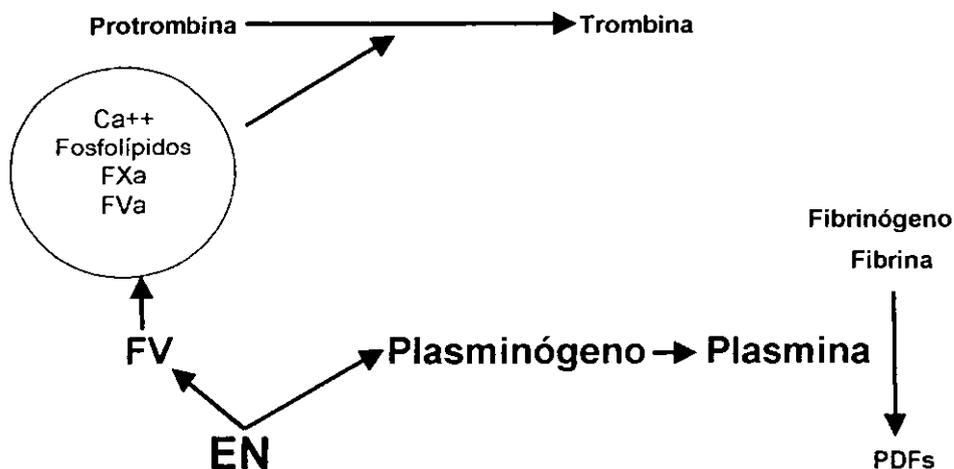


Fig. 1. Activación de la protrombina hasta trombina por medio del complejo de protrombinasa (Ca^{++} , fosfolípidos, FXa y FVa) y de la fibrinólisis a partir de plasmina (PDFs: productos de degradación del fibrinógeno/fibrina).

Aunque las moléculas de adhesión (integrinas) son primordiales en la adhesión celular, existen otros mecanismos alternos que también son importantes. Estos mecanismos dependen de las proteínas de la MEC, la cual está constituida por fibronectina, colágeno, vitronectina y trombospondina (TSP). La TSP1 o plaquetaria, se denomina así porque fue en la plaqueta donde se aisló por primera vez. Posteriormente, se demostró que se sintetiza también en las células endoteliales, queratinocitos, células de la glía, megacariocitos, neumocitos, células musculares lisas, PMNs y en los monocito/macrófagos(27). Se trata de una proteína globular homotrimérica(28,29) En el trímero, las moléculas de TSP están unidas mediante puentes disulfuro localizados en la región N-terminal (Fig. 2). Cada molécula de TSP se compone de un dominio globular pequeño N-terminal de 30 kDa que se une a la heparina en su dominio de unión a la heparina (HBD); un dominio C-terminal de 80 kDa que se une a diversas células; y un dominio de 70 kDa (TSP-70) que une a los dos precedentes (Fig. 2). La TSP-70 se compone a su vez de 3 repeticiones tipo I y II y 12 repeticiones tipo III

que unen calcio a la molécula(30) (Fig 3). La TSP puede proteolizarse con trombina resultando dos fragmentos: el HBD y otro de 150 kDa que se mantiene como homotrímero ya que los puentes disulfuro se mantiene intactos (TSP-450) (Fig. 2). A su vez, la TSP-450 puede proteolizarse con quimotripsina produciéndose los fragmentos de 80 y 70 kDa antes referidos(31,32) (Fig. 3).

La TSP es una proteína multifuncional involucrada en adhesión celular, metástasis, inflamación, quimiotáxis, migración, proliferación celular, crecimiento y diferenciación, entre otras funciones(33-36). Estas funciones son posibles debido a que contiene múltiples dominios con capacidad de unión a células como plaquetas, PMNs, monocitos, fibroblastos y células malignas(37,38); a otras moléculas fibrinógeno, plasminógeno, fibronectina, colágeno(39-41); o por su capacidad para inhibir a algunas enzimas como la plasmina o la catepsina G(42,43). A este respecto y de importancia capital para el presente trabajo, la TSP inhibe competitiva e irreversiblemente a la EN y a la plasmina(44,45).

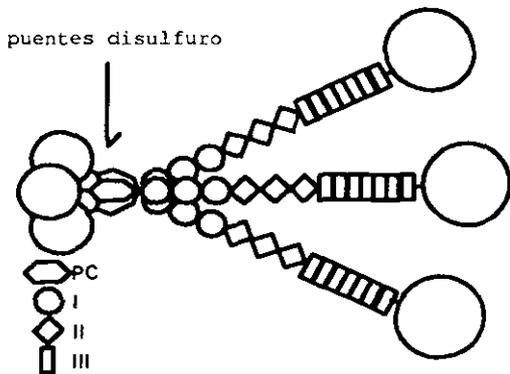


Fig. 2. El homotrímero de TSP. PC: región similar

al procolágeno, I: repeticiones tipo I, II: repeticiones tipo II, III: repeticiones tipo III (región de unión al calcio).

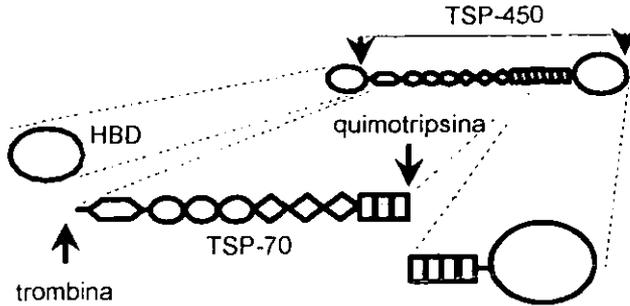


Fig. 3. Proteólisis de la molécula de TSP mediante trombina y quimotripsina.

El PMN expresa en su superficie dos receptores para la TSP(46). Uno de ellos reconoce una región localizada en el fragmento HBD de la molécula que tiene una secuencia que también reconoce la heparina. Por lo tanto, esta región de unión al PMN puede ser inhibida con heparina en el laboratorio. El segundo receptor para TSP en la superficie del PMN reconoce una secuencia localizada en la TSP-70(47), la cual no es inhibida con heparina pero es calcio dependiente y, por lo tanto, puede ser inhibida si la TSP se incubaba con EDTA.

La línea celular humana promielocítica maligna HL-60 es una variedad progenitora de PMNs. Estas células presentan activadores del plasminógeno y expresan EN sobre su membrana lo que le permite tener una participación importante en el desarrollo del sistema de coagulación y actividad fibrinolítica(47). Las HL-60 se diferencian hacia diversos tipos celulares hematológicos dependiendo del estímulo al que es sometida. Así, la estimulación con dimetilsulfóxido (DSMO) o ácido transretinoico (ATRA) las convierte en PMNs(48), mientras que la estimulación con monoacetato de porbol (PMA) las diferencia hasta monocitos(49).

El ácido transretinoico es un derivado de la vitamina A con efectos potentes sobre desarrollo y diferenciación(50). Se han identificado como miembros de la familia de receptores nucleares para el ácido transretinoico los grupos RAR y RXR y sus respectivas

isoformas α , β , γ , sirviendo también como receptores para vitamina D3, hormonas tiroideas y esteroides (51,52). Los receptores RARs se unen al all trans ácido retinoico y al 9-cis ácido retinóico, mientras que los RXRs se unen sólo al 9-cis ácido retinoico. Las alteraciones en los receptores del ácido retinóico han sido asociadas con neoplasias, carcinoma hepatocelular y leucemia promielocítica aguda. El ácido transretinoico se une a las proteínas CRABPI y CRABPII (citósolic celular retinoico acid binding protein) y es transportado al núcleo celular para unirse a los grupos de receptores RAR y RXR(52).

Las HL-60 expresan únicamente el receptor para el HBD no así el localizado en la TSP-70. Sin embargo, el tratamiento de las HL-60 con ATRA induce no sólo la diferenciación de esta célula hacia PMN, sino también la expresión de ambos receptores para la TSP produciendo con esto un incremento en el número de moléculas de TSP unidas sobre la membrana del PMN. Además, la expresión del segundo receptor permite una mayor adherencia de HL-60 a una superficie cubierta con TSP(51), lo que implica que la región responsable de la adherencia de PMNs mediada por TSP puede localizarse en la TSP-450.

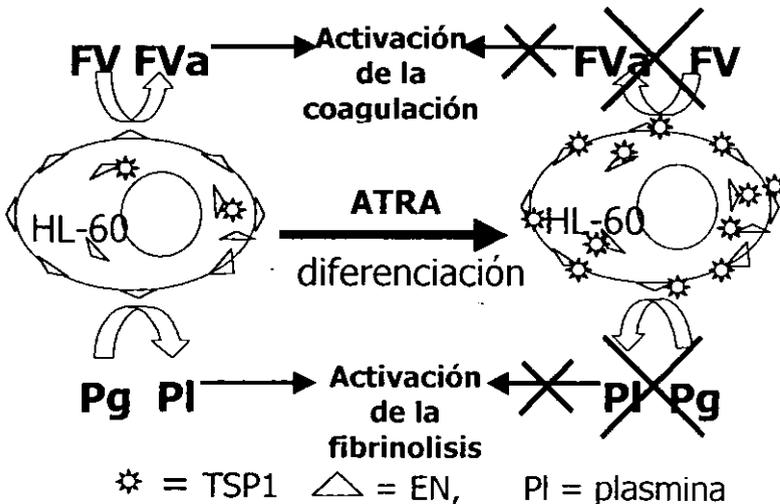


Fig. 4. Efecto del ATRA sobre la fisiología de la célula HL-60 en relación a la activación de la hemostasia y la fibrinólisis.

El objetivo de este estudio fue, utilizando un modelo celular, determinar el papel de la TSP en la regulación de la actividad de la EN y su consecuente impacto sobre los sistemas de coagulación y fibrinólisis (Fig. 4). Para esto, manipulamos el modelo celular (células HL-60), mediante su tratamiento con ATRA con el objeto de inducir la expresión celular de los receptores necesarios para una adecuada función de la TSP y evaluar mejor su efecto regulatorio sobre la EN.

JUSTIFICACION.

El fenómeno inflamatorio juega un papel esencial en una gran variedad de procesos tanto fisiológicos (inmunidad, coagulación), como fisiopatológicos (fenómeno isquemia-reperusión, metástasis, aterogénesis, autoinmunidad y sepsis). El PMN por su gran capacidad adhesiva, proteolítica y migratoria tiene un papel central en el componente celular inflamatorio agudo.

Se sabe que tanto la activación excesiva del PMN como la disfunción de los sistemas de coagulación y fibrinólisis tienen una estrecha relación en el fenómeno inflamatorio. El PMN contiene en sus gránulos enzimas que tienen una amplia participación en el fenómeno inflamatorio al actuar sobre diversos sustratos entre ellos factores de coagulación y proteínas con actividad fibrinolítica. La TSP, una proteína que también se encuentra dentro de los gránulos de los PMNs, inhibe irreversiblemente a la EN .

El conocimiento de las bases moleculares del reclutamiento celular y de la regulación de los sistemas de coagulación y fibrinólisis que ocurren en la respuesta inflamatoria es fundamental para el desarrollo de estrategias encaminadas a controlar el daño tisular asociados con eventos inflamatorios generalizados. Ya que la EN es una enzima muy importante en la fisiología del PMN por su gran capacidad proteolítica, es importante determinar como se lleva a cabo la regulación de su actividad. La TSP es un inhibidor directo de la EN, por lo tanto, la relación existente entre ambas proteínas en la membrana del PMN puede ser crucial para el entendimiento de la fisiopatología del PMN. Las células malignas promielocíticas humanas HL-60 proveen un modelo celular experimental que nos permite estudiar la expresión de receptores mediante su diferenciación con ATRA, analizar las interacciones entre TSP-PMN-EN y conocer la función de este complejo como un probable mecanismo que intervenga indirectamente en las reacciones de coagulación y fibrinólisis en la respuesta inflamatoria.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

PREGUNTA DE INVESTIGACION.

¿Cuál es el efecto de la TSP en la membrana de las células HL-60 inducidas a la maduración mediante ATRA sobre la actividad de la EN expresada también sobre la membrana de estas células?

PREGUNTAS ESPECÍFICAS.

¿Cómo es regulada la actividad de la EN por la TSP unida a la membrana de las HL-60 antes y después de ser tratadas con ATRA?

¿Cómo se modifica la activación de las reacciones de coagulación dependiente de la EN por la TSP unida a la membrana de las HL-60 antes y después de ser tratadas con ATRA?

¿Cómo se modifica la activación de la fibrinólisis dependiente de EN por la TSP unida a la membrana de las HL-60 antes y después de ser tratadas con ATRA?

HIPOTESIS.

HIPOTESIS GENERAL.

El aumento en la unión de TSP a la membrana de las células HL-60 inducidas a la maduración mediante ATRA, disminuye la actividad de la EN sobre la membrana de estas células.

HIPOTESIS ESPECÍFICAS.

Al incrementar el número de moléculas de TSP unidas a la membrana de las HL-60, la maduración celular inducida por el ATRA disminuye la actividad de la EN.

Al incrementar el número de moléculas de TSP unido a la membrana de las HL-60, la maduración celular inducida por el ATRA disminuye la activación de las reacciones de coagulación dependiente de la EN.

Al incrementar el número de moléculas de TSP unido a la membrana de las HL-60, la maduración celular inducida por el ATRA disminuye la activación de la fibrinólisis dependiente de la EN.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

En células HL-60 con maduración inducida por ATRA, determinar el efecto regulador de la TSP sobre la actividad de la EN sobre la membrana de estas células.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Determinar la capacidad de la TSP unida a la membrana de las HL-60 para regular la actividad de la EN.

Determinar la capacidad de la TSP unida a la membrana de las HL-60 para regular la activación de las reacciones de coagulación dependiente de la EN.

Determinar la capacidad de la TSP unida a la membrana de las HL-60 para regular la activación de la fibrinólisis dependiente de la EN.

MATERIAL Y METODOS.

A. LUGAR DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO.

The Sol Sherry Thrombosis Research Center, Laboratory of Pathology and Laboratory Medicine, Temple University, Philadelphia, PA.

B. UNIVERSO DE ESTUDIO.

Células HL-60, tratadas y no tratadas con ATRA.

C. TIPO DE ESTUDIO.

Básico. Experimento biomédico.

D. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.

Se incluyeron cultivos que reunieran los siguientes criterios:

- Viabilidad celular > 98%
- Edad de las cepas celulares no mayor de 5 recambios del medio de cultivo.
- Diferenciación hasta PMNs > 90%.
- Contaminación del cultivo celular.
- Se excluyeron los cultivos contaminados durante los ensayos.

E. TAMAÑO DE MUESTRA.

Por ser un estudio experimental básico no requiere determinación del tamaño de muestra.

Cada mililitro de cultivo celular contiene 1×10^6 células y cada ensayo se repitió 5 veces.

F. VARIABLES.

F1. Independiente.

• Tratamiento con ATRA. Categorías: células HL-60, con y sin tratamiento.

F2. Dependientes.

- Actividad espontánea de EN sobre la membrana de las HL-60.
- Reacciones de coagulación dependiente de células en la membrana de las HL-60.
- Actividad fibrinolítica dependiente de células en la membrana de las HL-60.

G. DESCRIPCION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES.

Tratamiento con ATRA. Adición al medio de cultivo celular de ATRA en una concentración final de 1 μM .

Células HL-60. Línea celular promielocítica humana.

Células HL-60 diferenciadas con ATRA. Línea celular promielocítica tratada con 1 μM de ATRA por 72 h con un 90% de diferenciación hacia neutrófilos.

Coagulación. Cantidad de sustrato específico S-2238 hidrolizado, el cual es directamente proporcional a la formación de trombina generada. Medido en una escala variable continua: μM de S-2238.

Fibrinólisis. Cantidad de sustrato específico S-2251 hidrolizado, el cual es directamente proporcional a la formación de plasmina formada. Medido en una escala variable continua: μM de S-2251.

Actividad enzimática de la EN. Capacidad de la enzima EN de actuar sobre su sustrato cromogénico específico S-2484. medido en una escala variable continua: μM de S-2484.

H. PROCEDIMIENTOS.

H.1. Material.

Los factores II, V, VII, X y Xa así como la TSP y la EN purificados se obtuvieron de Haematologic Technologies (Maracato, VA). El activador tisular del plasminógeno se obtuvo

de Kabi Vitrum (Estocolmo, Suecia). El anticuerpo monoclonal murino anti-TSP humana y el anticuerpos policlonal murino anti-plasminógeno humano se obtuvieron de Life Technologies (New York, NY), mientras que el anticuerpo monoclonal murino anti-FV humano se obtuvo de Sigma Chemical (St. Louis, MO.). El Eglin fue una donación del doctor E. Shapiro del Laboratorio de Trombosis y Hemostasia de la Universidad de Pensilvania. Los buffers HEPES y Hank's se obtuvieron de Gibco BRL (Grand Island, NY). Los reactivos y materiales para la electroforesis de proteínas y transferencia para los estudios de Western Blot tales como geles de poliacrilamida, estándares para pesos moleculares y buffers, se obtuvieron de Bio-Rad Inc (Hercules, CA). Se utilizó un equipo para electroforesis de proteínas Mini-PROTEAN II y un equipo Trans-Blot SD para la transferencia electroforética de proteínas con técnica semi-seca, ambos de la marca Bio-Rad Inc (Hercules, CA). El cloruro de calcio, el ácido acético glacial y el fMLP se obtuvieron de SIGMA-Chemical (St. Louis, MO). Los substratos cromogénicos específicos para la trombina (S-2238) y para la plasmina (S-2251), se obtuvieron de Chromogenix (West Chester, OH). El material desechable para el cultivo celular como pipetas de 2, 5 y 10 ml, frascos de plástico estéril para cultivo celular con tapa y membrana ventilatoria de 25 y 75 cm², y los microplatos de cultivo de 6 posos, se obtuvieron de Falcon (Fisher Scientific, Palo Alto, CA). El ATRA (pm = 300 KDa) (Sigma-Chemical, St. Louis, MO), se preparó como solución patrón adicionando 3µm de ATRA en 10 ml de etanol al 100% y se almacenó a -20° por un período no mayor a 7 días. Las alícuotas de 1ml se colocaron en tubos Eppendorf y se cubrieron con papel aluminio para su protección de la luz y evitar cambios continuos de temperatura.

H.2. Células.

Se utilizó la línea celular promielocítica humana HL-60 que se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD). Las células fueron cultivadas en frascos con

medio de cultivo celular RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina y suplementado al 10% con suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), y 1 ml de gentamicina (50mg/ml) (Gibco BRL, Grand Island, NY). La viabilidad celular fue evaluada mediante el uso del colorante azul de triphan el cual tiene afinidad por las proteínas de membrana celular. Las células teñidas de color azul fueron excluidas ya que esto es indicativo de muerte celular debido a que el colorante penetró al interior de la célula. El procedimiento de conteo celular se llevó a cabo obteniendo 1 ml de cultivo celular en un tubo cónico estéril de plástico. Posteriormente, 50 μ l de la muestra fue transferida a un segundo tubo de las mismas características y se adicionó la misma cantidad de azul de trifán. Diez μ l de la muestra se colocaron en una cámara para conteo celular (hemocitómetro), contando un total de 200 células utilizando un microscopio de luz. El conteo se realizó en los cuadrantes superior e inferior externos y la cuenta total de células se dividió entre 4 (número de cuadrantes contados). Se obtuvo el promedio de cada una de las cuentas y el resultado se multiplicó por 2 debido a que a la muestra celular se le adicionó el mismo volumen de azul de trifán (factor de dilución = 2). Se obtuvo así la concentración celular ($\times 10^6$ células/mL), la cual fue manipulada al final con la adición de medio de cultivo para obtener la concentración celular adecuada en los experimentos.

H.3. Preparación de las células para cultivo. Siembra primaria y resiembras.

Para descongelar las células cuando llegan de la casa productora, suspendidas en 1.5 ml de medio de criopreservación que contiene DMSO, fueron colocadas por un lapso de 2h a -20°C y luego fueron transferidas a un refrigerador a -4°C por un tiempo similar al anterior. Posteriormente, las células se colocaron a 37°C en baño María por 5 min (tiempo suficiente para ver el descongelamiento de la suspensión). El tapón se limpió con etanol y se retiró. Se pipeteó repetidas veces el contenido del tubo con una pipeta de plástico estéril para recuperar todas las células adheridas a la pared del tubo. Esta siembra primaria se depositó

en 9 mL de medio de cultivo fresco y se guardó en la incubadora de CO₂ al 5% y a 37°C por un periodo de 24 a 48 h. Al final de este periodo, la muestra se colectó nuevamente, se centrifugó y se depositó en medio de cultivo fresco que ya no contiene DMSO. Esta preparación o siembra secundaria, se incubó por 4 días. Posteriormente, 1ml de la suspensión conteniendo 1×10^6 células/ml se transfirió a un frasco de plástico estéril de 25 cm² para que comenzaran las divisiones necesarias. Todos los procedimientos descritos se realizaron bajo técnica estéril utilizando una campana de flujo laminar (Fisher Scientific, Palo Alto, CA).

H.4. Preparación del medio de cultivo.

En un frasco de 500ml para cultivo celular se adicionó RPMI enriquecido con L-glutamina y suplementado al 10% con suero fetal bovino y 1 ml de gentamicina (50mg/ml), mezclándose con movimientos circulares. El procedimiento de preparación se realizó bajo técnica estéril. Los frascos con el medio se almacenaron a 4°C para su conservación. Cuando el medio era requerido, los frascos se descongelaron por 30 min a 37°C en baño María antes de su uso. Una vez preparado el medio de cultivo se dividió en alícuotas y fue guardado en tubos cónicos estériles de plástico. Se conserva por un tiempo no mayor de 15 días para evitar su contaminación.

H.5. Diferenciación celular.

Posterior a la resiembra y una vez obtenido el crecimiento adecuado, se procedió a diferenciar las células mediante el ATRA. Para los estudios de diferenciación celular, 1×10^6 células/ml se colocaron en microplatos de 6 posos en presencia ATRA a una concentración final 1 μ M. De un frasco de cultivo colocado en la incubadora se tomaron las muestras para realizar el conteo celular. Se verificaba la cantidad celular requerida (1×10^6 células/ml) mediante azul de trifán (ver antes). Se adicionaron entonces 10 μ l de solución patrón de

ATRA (10mM) obteniéndose una concentración final de $1\mu\text{M}$ de ATRA y 0.1 de etanol al 100% en los 10ml de cultivo que contenía el frasco de cultivo. El frasco se colocó nuevamente en la incubadora y a las 72 h se obtuvo 1 ml de las células tratadas con ATRA para conteo celular. Además del conteo celular, se realizaba frotis para tinción de Wright para conteo diferencial en 200 células. Una vez obtenidas las cifras requeridas (98% de viabilidad y 1×10^6 células/ml), así como una cuenta diferencial adecuada (95% de neutrófilos), se tomaron 35 μl de la muestra para los experimentos.

H.6. Estudios enzimáticos.

Para determinar el efecto de la TSP unida a la membrana de las HL-60, antes y después de ser tratadas con ATRA, sobre la fisiología de los sistemas hemostático y fibrinolítico, utilizamos principalmente pruebas enzimáticas. Ya que los sistemas hemostático y fibrinolítico son esencialmente enzimáticos, utilizamos cromógenos específicos para cada una de las enzimas generadas al final de las reacciones. El sistema experimental fundamental siempre consistió de 1×10^6 células HL-60, antes y después de la inducción de su maduración con ATRA y, debido a la dependencia fisiológica de la TSP por el calcio, a todos los experimentos adicionamos 50 μl de CaCl_2 (concentración final 30 mM). El volumen final de la reacción siempre se aforó a 300 μL con buffer de Hank's o con buffer HEPES (para los estudios de fibrinólisis). Cuando era necesario saturar los receptores para TSP en la superficie de las células HL-60, al sistema se le adicionó TSP purificada (9.8 mM). De acuerdo al tipo de reacción estudiada, se añadía el complejo enzimático o los factores hemostáticos o fibrinolíticos necesarios para llevar a cabo las reacciones. Las reacciones se incubaron a 37 °C por 5 min y, posteriormente, procesamos las reacciones necesarias para cada experimento adicionando sustratos cromogénicos, otras enzimas e inhibidores enzimáticos. Para inhibir el efecto de la EN, se utilizó Eglin (4.4 nM), un inhibidor específico

de la EN. Las reacciones enzimáticas finales se detuvieron adicionando 50 μ l de ácido acético glacial al 50% (vol:vol, agua bidestilada) a diferentes intervalos. Las lecturas de los experimentos, dependientes de la concentración del sustrato cromogénico liberado en cada reacción, se hicieron en un lector de platos de ELISA a 405 nm. Los resultados se expresaron en promedio \pm 1DS nM del sustrato cromogénico liberado en base a curvas de calibración específicas para cada enzima.

Cuando se quería establecer el efecto de las diversas enzimas sobre la membrana celular activada, utilizamos un activador específico de la línea granulocítica, fMLP (10 nM), el cual se incubó con las células HL-60 antes de la adición de los reactivos específicos.

Para determinar el efecto de la EN sobre la activación del FV, utilizamos el sobrenadante de células HL-60 encubadas con FV el cual luego se llevó a un tubo en el que se ensambló el complejo de protrombinasa. Para llevar a cabo esto fisiológicamente, creamos en el sistema un complejo protrombinasa agregando FXa 5 nM, FII 1.4 μ M, vesículas de fosfolípidos 5 nM y FV 43 nM, en presencia de CaCl_2 30 mM. Luego de 5 min de incubación, se obtenían 100 μ l de la mezcla y se adicionaban 150 μ l del sustrato cromogénico S-2238 (sustrato cromogénico específico para la trombina). Finalmente, para determinar la especificidad del efecto de una proteína en específico, utilizamos anticuerpos monoclonales específicos contra dicha proteína: anti-TSP humana (1 μ M), anti-FV humano o anti-plasminógeno humano.

Para determinar la actividad fibrinolítica en las células HL-60, llevamos a cabo estudios de fibrinólisis enzimática utilizando, prácticamente, la metodología descrita para los estudios de coagulación con algunos cambios leves. Empleamos plasminógeno 2 μ M y el sustrato cromogénico S-2251. Las reacciones se incubaron por 15 min a 37 °C en presencia de tanto buffer HEPES como fuera necesario para llevar el volumen final de la reacción a 300 μ l. Ciento cincuenta μ l de esta reacción se adicionaron a 150 μ l del sustrato cromogénico S-

2251 y las reacciones se detuvieron a diferentes intervalos adicionando 150 μ L de ácido acético glacial al 50% (vol:vol, agua bidestilada). La lectura de las reacciones se realizó en un lector de platos de ELISA a 405 nm. Al igual que en las reacciones hemostáticas y dependiendo del tipo de reacción que se deseaba analizar, se adicionaron TSP purificada (9.8 mM) o anticuerpos monoclonales específicos. Todos los resultados se expresaron en promedio \pm 1DS nM del sustrato cromogénico liberado sobre la base de una curva de calibración con la enzima respectiva purificada.

J.7. Western Blot.

Para establecer la presencia de FV o plasminógeno en el sobrenadante celular y su ruptura enzimática, se procedió a realizar Western Blot. Para el análisis de SDS-PAGE (gel para electroforesis de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato), se tomaron los sobrenadantes de los experimentos. Utilizamos un estándar para pesos moleculares y las proteínas purificadas a estudiar como control positivo. Las muestras fueron hervidas a 90 °C por 2 min en presencia de un agente reductor y sometidas a SDS-PAGE. Las muestras se corrieron por 45 minutos en un gel de gradiente 4-20% y se realizó la transferencia a papel de nitrocelulosa por 45 min. La muestra fue bloqueada con licor irlandés de leche al 10% y se procedía a lavar dos veces con agua bidestilada. La membrana se encubó entonces con un Ac policlonal murino contra la proteína a estudiar y se desarrollaba la reacción.

K. ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados se expresan como medidas de tendencia central y dispersion; medias y desviaciones estándar de los resultados obtenidos en cada experimento. Para comparar los resultados de experimentos similares entre sus puntos de corte correspondientes utilizamos a prueba de t pareada. Para comparar los resultados de un mismo experimento en diferentes

tiempos, utilizamos una prueba de t de Student. Las diferencias entre los experimentos fueron significativas cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS.

1. **Actividad de la EN sobre la membrana de las células HL-60 antes y después de la maduración celular inducida por ATRA.** Inicialmente, debíamos demostrar que el ATRA modulaba la actividad de la EN sobre la membrana de las células HL-60. Para conocer la actividad de EN, las células HL-60, antes y después del tratamiento con ATRA, se incubaron con un cromógeno específico para EN (Fig. 5).

		P
△ 5 min	△ 30 min	0.0001
◆ 5 min	◆ 30 min	0.0001
□ 5 min	□ 30 min	0.001
● 5 min	● 30 min	0.001
△ 30 min	□ 30 min	0.00001
◆ 30 min	● 30 min	0.005
△ 30 min	◆ 30 min	0.0001
□ 30 min	● 30 min	0.004

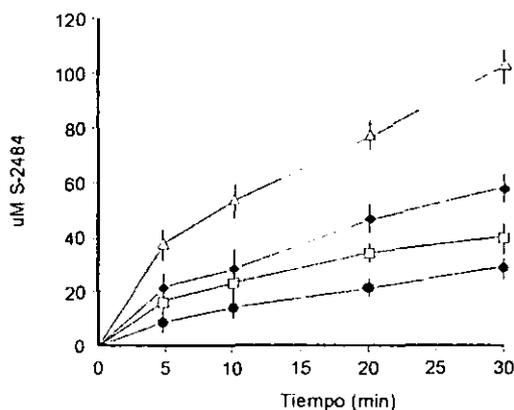


Fig. 5. Efectos de la maduración inducida por el ATRA y de la adición de TSP purificada sobre la actividad de la EN de las células HL-60. Incubamos células HL-60 antes (triángulos) y después del tratamiento con ATRA (cuadros), en presencia de CaCl_2 y buffer Hank's. En otros tubos, colocamos células HL-60 antes (diamantes) o después del tratamiento con ATRA (círculos), con CaCl_2 , buffer Hank's y TSP purificada. Luego de la incubación se agregó el sustrato cromogénico S-2484. Los resultados se expresan en promedio \pm 1DS nM del sustrato cromogénico liberado en 5 experimentos en base a una curva de calibración con EN purificada.

Desde el principio del experimento hubo diferencia en la actividad de la EN: mayor en las células HL-60 sin tratamiento con ATRA. Esto concordaba con la hipótesis que suponía que la maduración inducida por el ATRA y el consecuente aumento en la capacidad para fijar TSP a la membrana de la célula permitirían una mayor regulación de la EN. Posteriormente, a las células HL-60 antes y después del tratamiento con ATRA, les agregamos TSP

purificada (saturación de receptores de la membrana), para determinar si aumentaba la regulación. La figura 5 muestra como la adición de TSP purificada incrementó la modulación de la EN en comparación con los controles (aunque no fue completa). Así, la TSP en la membrana celular modula eficiente pero incompletamente a la EN.

Una vez demostrada la actividad de EN sobre la membrana de las celular y sabiendo su comportamiento luego del tratamiento con ATRA o de la adición de TSP purificada, investigamos su efecto en células HL-60 activadas. Al activar las células con fMLP se indujo la expresión máxima de EN y TSP en su membrana. Como muestra la figura 6, las curvas fueron similares a las del experimento inicial, es decir, tanto las células HL-60 tratadas con ATRA como las incubadas con TSP tuvieron la mayor regulación de EN. Es de hacer notar que, al comparar cualquier punto la actividad de las células HL-60 sin activar contra células activadas, siempre fue mayor en estas últimas. Así, la activación celular induce un aumento de la actividad de EN la cual, a pesar de ser regulada por TSP, no es del todo suprimida.

		p
◇ 5 min	◇ 30 min	0.0001
○ 5 min	○ 30 min	0.001
▲ 5 min	▲ 30 min	0.0001
■ 5 min	■ 5 min	0.03
◇ 30 min	▲ 30 min	0.001
○ 30 min	■ 30 min	0.03

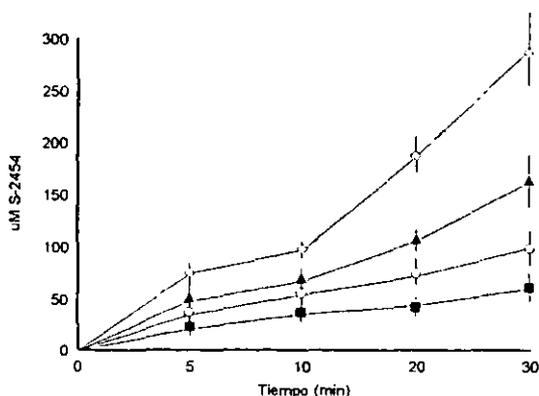


Fig. 6. Efectos de la maduración inducida por el ATRA y de la adición de TSP purificada sobre la actividad de la EN de las células HL-60 activadas. Incubamos las células HL-60 antes (diamantes) o después de ser tratadas con ATRA (círculos), con CaCl_2 y buffer Hank's. A otras células antes (triángulos) o después de ser tratadas con ATRA (cuadros), adicionamos TSP purificada, CaCl_2 y buffer Hank's. A todos los tubos se les adicionó fMLP, se incubaron y les agregamos el sustrato cromogénico S-2484. Los resultados se expresan en promedio \pm 1DS nM del sustrato cromogénico liberado en 7 experimentos en base a una curva de calibración con EN purificada.

2. Efectos de la maduración inducida ATRA y de la activación celular sobre la activación del FV. Al demostrar que la actividad enzimática de las células HL-60 era dependiente de la maduración, de la presencia de EN y TSP en la membrana y de la activación celular, diseñamos un experimento para investigar su traducción fisiopatológica. Repetimos los experimentos antes reseñados con los cambios necesarios para determinar si EN activaba al FV. Para esto, el sobrenadante de células HL-60 incubadas con FV se llevó a un tubo en el que se preparaba el complejo de protrombinasa. La activación de la protrombina se determinó por la liberación de un sustrato cromogénico específico para la trombina. La figura 7 muestra que los resultados de los experimentos con FV fueron similares a los encontrados antes para la actividad de EN. Es decir, la maduración celular inducida por ATRA disminuye significativamente la activación del FV. Además, en la comparación punto por punto, se encontró que la activación celular permitió una mayor activación del FV.

		p
△ 5 min	△ 30 min	0.0001
★ 5 min	★ 30 min	0.0003
★ 30 min	△ 30 min	0.01
◆ 30 min	□ 30 min	0.04

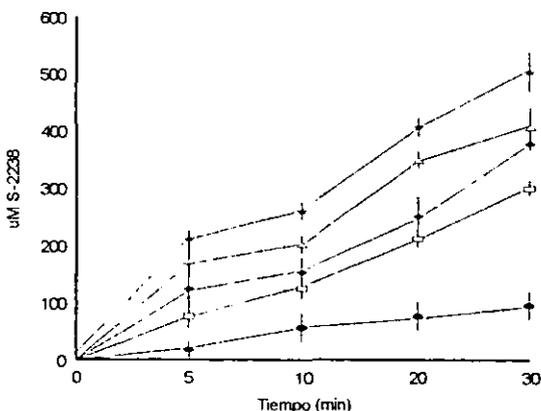


Fig. 7. Efecto de la maduración celular inducida por el ATRA y de la activación celular sobre la actividad enzimática del FV. Incubamos células HL-60 antes (triángulos) o después de ser tratadas con ATRA (rectángulos), con CaCl₂, FV y buffer Hank's. En otros tubos, colocamos los mismos reactivos con células antes (asteriscos) o después de ser tratadas con ATRA (diamantes), adicionando fMLP y buffer Hank's. En un tubo control, colocamos células HL-60 luego de ser tratadas con ATRA con los mismos reactivos de las reacciones previas excepto FV (círculos). Las reacciones se incubaron y agregamos Eglín. En la fase B, a todos los tubos se les agregó FXa, FII y vesículas de fosfolípidos. Luego de 5 min de incubación, obtuvimos 100 μl de la mezcla y adicionamos el sustrato cromogénico S-2238. Los resultados se expresan en promedio \pm 1DS nM del sustrato cromogénico liberado en 8 experimentos en base a una curva de calibración con trombina purificada.

Para nuestra sorpresa, el tubo sin FV mostró actividad de trombina. La única explicación para este hallazgo era que existiera FV dentro de las células HL-60 y que saliera de la célula luego de la activación con fMLP. Hasta ahora, no existe información en la literatura acerca de este hallazgo. Para demostrar esto, realizamos Western Blot para determinar la ruptura hipotética del FV. La figura 8 muestra un Western Blot de los sobrenadantes del experimento antes descrito. Se muestra la ruptura del FV dependiente del tiempo, como lo sugerían los resultados de los estudios funcionales. La acción de la EN sobre el FV se aprecia en la desaparición gradual de la banda original de FV y la aparición de bandas de ruptura de FV.

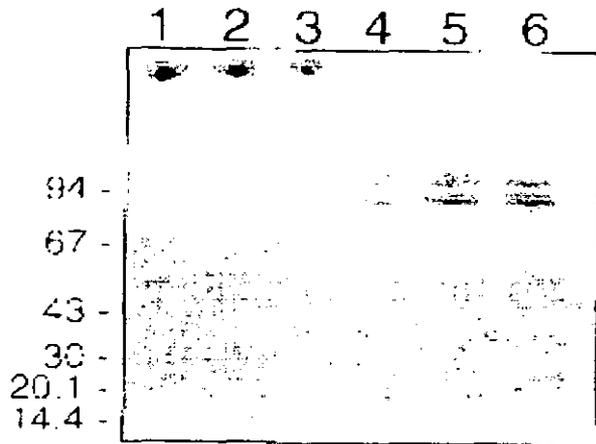


Fig. 8. Efecto de la EN sobre el FV de la coagulación en un Western Blot. Para realizar el análisis de SDS-PAGE utilizamos los sobrenadantes de los experimentos correspondientes a la figura 6. En el carril 1 se colocó FV purificado; en el 2, una muestra del tubo control al que no se adicionó FV; en los tubos 3 a 6 los sobrenadantes de las alícuotas de los diversos intervalos del experimento 6. Luego de la transferencia, la membrana se incubó con un Ac policlonal murino anti-FV humano y se desarrolló la reacción.

Con la evidencia de la activación del FV en las células HL-60, pasamos a corroborar esta observación. Usando Eglín, diseñamos algunos experimentos para determinar si las observaciones previas eran debidas a la activación dependiente de EN. La figura 9 muestra los experimentos en los que observamos la actividad de la EN sobre el FV y de éste, a su vez, sobre el complejo de protrombinasa.

		P
◆ 30 min	★ 30 min	0.00015
★ 30 min	□ 30 min	0.002
★ 30 min	▲ 30 min	0.0001
★ 30 min	⊕ 30 min	0.001
★ 30 min	○ 30 min	0.00003

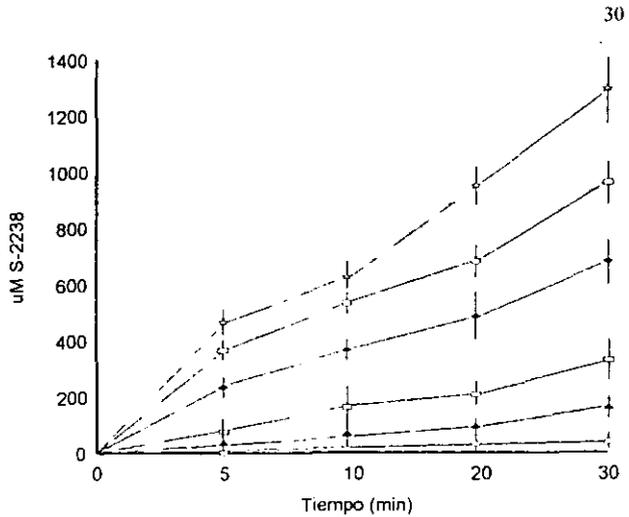


Fig. 9. Efecto de la activación celular, de los reguladores de la EN y de un anticuerpo monoclonal anti-TSP sobre la actividad enzimática del FV. En la fase A de un primer grupo de ensayos, incubamos células HL-60 sin tratamiento con ATRA (diamantes), con CaCl_2 , FV y buffer Hank's. En otro tubo colocamos los mismos reactivos adicionando fMLP (estrellas). Las reacciones se incubaron y se les agregó Eglín. En la fase B, a ambos tubos les agregamos FXa, FII y vesículas de fosfolípidos. Luego de 5 min de incubación, obtuvimos 100 μl de la mezcla y adicionamos el sustrato cromogénico S-2238. En la fase A de un segundo grupo de ensayos, a las células HL-60 sin tratamiento con ATRA les adicionamos FV, CaCl_2 y fMLP. A uno de estos tubos se le agregó simultáneamente TSP1 purificada (cuadros), Eglín (triángulos), o un anticuerpo monoclonal anti-TSP humana (signos de más). En un tubo final se colocaron células HL-60 sin tratamiento con ATRA y les adicionó FV, CaCl_2 y, simultáneamente, Eglín (círculos). En la fase B, a todos los tubos les agregamos FXa, FII y vesículas de fosfolípidos. Luego de 5 min de incubación, obtuvimos 100 μl de la mezcla y se adicionó el sustrato cromogénico S-2238. Los resultados se expresan como promedio \pm 1DS nM del sustrato cromogénico liberado en 7 experimentos en base a una curva de calibración con trombina purificada.

Se reprodujeron dos de los datos del experimento anterior utilizando células HL-60 antes de ser tratadas con ATRA y demostramos nuevamente que en presencia de estas células el FV se activaba. Posteriormente, diseñamos dos experimentos para demostrar que, a pesar de la activación celular, la activación del FV disminuía. Para tal efecto, se incubó en un tubo TSP purificada (para modular directamente a la EN intracelular liberada luego de su activación), y en otro Eglín. En ambos casos observamos que la actividad del FV disminuyó por debajo de lo encontrado en las células HL-60 no activadas, demostrando que la actividad era generada por la EN. Posteriormente, a las células HL-60 antes del tratamiento con ATRA

se les agregó desde el principio de la reacción Eglin. El resultado fue una inhibición casi total de la actividad del FV. Finalmente, para determinar la especificidad de la inhibición por TSP, realizamos un experimento utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TSP. Observamos un incremento por arriba de los niveles alcanzados con cualquiera otro en la liberación del sustrato cromogénico.

Los resultados de estos experimentos demuestran que la célula HL-60, antes de ser tratada con ATRA o sin activar, activa al FV. Más aún, luego de la activación celular, la activación de FV aumenta considerablemente. Por otra parte, aún con la célula activa, si se expone a dos inhibidores directos de la EN, disminuye la activación de FV por debajo de la activación obtenida con la célula HL-60 no activada. Todavía más, en la célula no activada, la incubación con Eglin desaparece casi completamente la activación del FV. Finalmente, cabe resaltar que si la célula activada se incubaba con un anticuerpo monoclonal anti-TSP, se obtiene la máxima activación del FV. Estos resultados demuestran que la célula HL-60 tiene efecto directo sobre la activación del FV y que este efecto es dependiente de EN.

3. Efectos de la maduración celular inducida por ATRA Y de la EN sobre la activación del plasminógeno. En esta parte del estudio, intentamos determinar el papel de la maduración celular inducida por el ATRA y el de la EN sobre la fibrinólisis, específicamente, en cuanto a la activación del plasminógeno. Utilizando un sustrato cromogénico específico para la plasmina (S-2251), procedimos a evaluar la generación de esta enzima en el sistema celular. El primer experimento fue diseñado para determinar si las células HL-60 podían activar al plasminógeno (Fig. 10).

		p
⊕ 5 min	⊕ 30 min	0.0001
◆ 5 min	◆ 30 min	0.6
⊕ 30 min	△ 30 min	0.01
□ 30 min	● 30 min	0.04

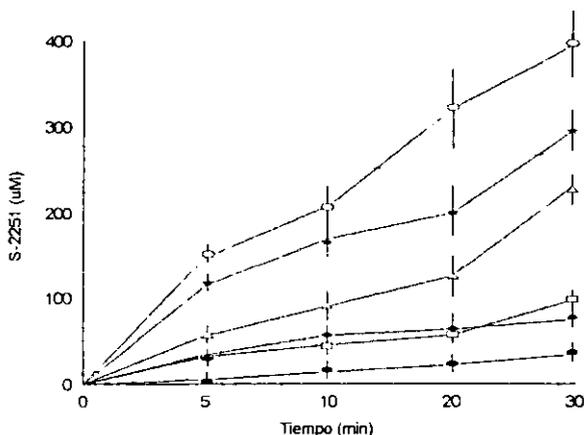


Fig. 10. Efectos de la maduración inducida por el ATRA, de la TSP purificada y de un anticuerpo monoclonal anti-TSP sobre la activación del plasminógeno mediada por la EN. Las células HL-60 antes (signos de más) o después del tratamiento con ATRA (diamantes), fueron incubadas con plasminógeno y buffer HEPES y la reacción se detuvo con Eglin. A 150 µl de esta reacción adicionamos 150 µl del sustrato cromogénico S-2251. En otro tubo, a las células HL-60 antes (triángulos) o después de ser tratadas con ATRA (círculos), les adicionamos plasminógeno y TSP purificada. Las reacciones se incubaron y la reacción se detuvo con Eglin. A 150 µl de esta reacción adicionamos 150 µl del sustrato cromogénico S-2251. En otros tubos, a las células HL-60 antes (asteriscos) o después del tratamiento con ATRA (cuadros abiertos), las incubamos con un anticuerpo monoclonal anti-TSP humana y plasminógeno y luego se añadió el activador tisular del plasminógeno. Luego de la incubación se agregó Eglin. A 150 µl de esta reacción adicionamos 150 µl del sustrato cromogénico S-2251. Los resultados se expresan en promedio \pm 1DS nM del sustrato cromogénico liberado en 5 experimentos sobre la base de una curva de calibración con plasmina purificada.

Encontramos que las células HL-60 activaban al plasminógeno y que la maduración celular inducida con ATRA disminuía esta activación. Como era de esperarse, en las células HL-60 tratadas o no con el ATRA se encontró una disminución de la activación de la plasmina cuando las incubamos con TSP purificada. Finalmente, y como se había encontrado con el FV, la incubación de las células HL-60 con un anticuerpo monoclonal anti-TSP aumentó la generación de plasmina.

Cuando demostramos que las células HL-60 activaban plasminógeno y que, en base a los resultados obtenidos, la EN era muy importante, decidimos investigar que ocurría en

presencia de células HL-60 activadas. La figura 11 muestra los resultados de estos experimentos.

		p
▲ 5 min	▲ 30 min	0,0001
■ 5 min	■ 30 min	0,001
▲ 30 min	■ 30 min	0,004
◇ 30 min	○ 30 min	0,00011

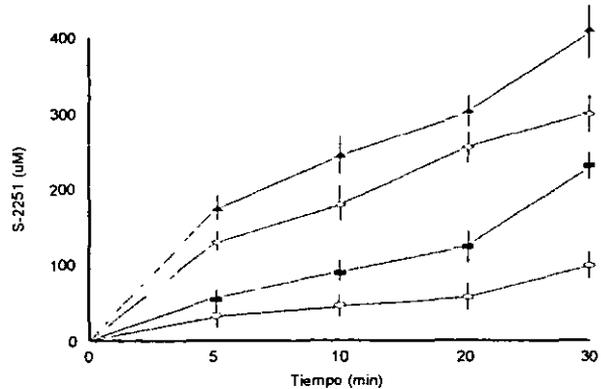


Fig. 11. Efectos de la activación celular sobre la activación del plasminógeno. Las células HL-60 antes (cuadros) o después del tratamiento con ATRA (círculos), fueron incubadas con plasminógeno y buffer HEPES. En otros dos tubos, a las células HL-60 antes (triángulos) o después del tratamiento con ATRA (diamantes), les adicionamos los mismos reactivos más fMLP. Las reacciones se detuvieron con Eglin. A 150 µl de estas reacciones adicionamos 150 µl del sustrato cromogénico S-2251. Los resultados se expresan en promedio \pm 1DS nM del sustrato cromogénico liberado en siete experimentos en base a una curva de calibración con plasmina purificada.

Una vez obtenida la evidencia funcional de la actividad fibrinolítica en la membrana de las células HL-60, se procedió a mostrar la proteólisis proteica mediante Western Blots. Para ello, se utilizaron los sobrenadantes de los tubos de reacción de los experimentos que se reseñan para la figura 11. Como se observa en la figura 12, la proteólisis del plasminógeno fue dependiente del tiempo tal y como lo mostraban los estudios funcionales. De esta manera, se muestran objetivamente los efectos observados en los estudios funcionales.

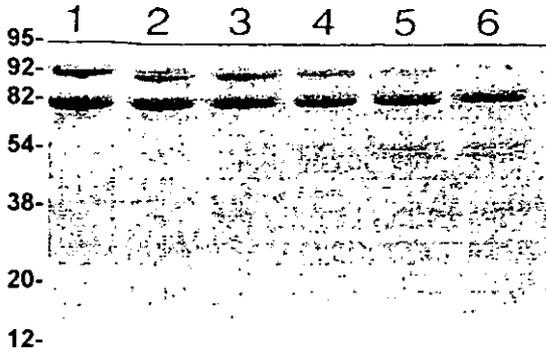


Fig. 12. Efecto de la actividad de la EN sobre el plasminógeno en un Western Blot. Para realizar el análisis de SDS-PAGE, utilizamos los sobrenadantes de los experimentos relacionados en la figura 10. Luego de la transferencia protéica, la membrana se incubó con un anticuerpo policlonal murino anti-plasminógeno humano y se procedió a desarrollar la reacción. En los dos compartimentos iniciales se colocó plasminógeno purificado y en las carriles posteriores las alícuotas correspondientes a los tiempos en los cuales fue detenida la reacción.

Luego de demostrar que la activación celular aumentaba la proteólisis del plasminógeno, era necesario determinar si este efecto era debido a la EN y se diseñaron los experimentos de la figura 13. Utilizamos nuevamente Eglin, TSP con el objeto de aumentar el efecto regulador de esta proteína sobre la EN y un anticuerpo monoclonal anti-TSP.

		p
☆ 30 min	◆ 30 min	0.0001
☆ 30 min	△ 30 min	0.01
☆ 30 min	□ 30 min	0.0001
☆ 30 min	◇ 30 min	0.08
☆ 30 min	● 30 min	0.00001

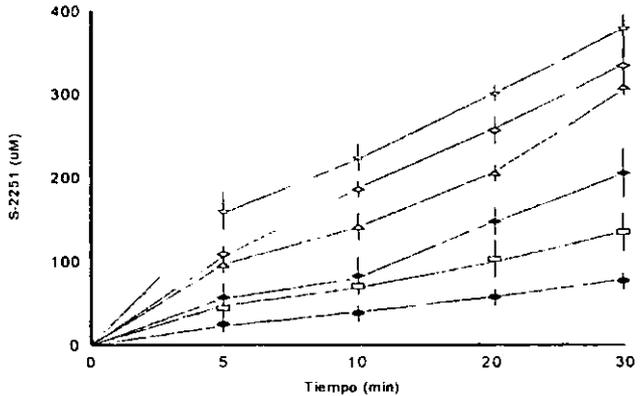


Fig. 13. Efecto de la activación celular, de la EN y de un anticuerpo monoclonal anti-TSP sobre la activación del plasminógeno. En un tubo inicial, incubamos células HL-60 antes del tratamiento con ATRA (diamantes), en presencia de CaCl₂, plasminógeno y buffer HEPES. Al mismo tiempo, a otro tubo con células HL-60 y con los mismos reactivos adicionamos fMLP (estrellas). Ambas reacciones se incubaron y se agregó entonces Eglin. Tomamos 150 µl de cada alícuota y les adicionamos 150 µl de sustrato cromogénico S-2251. En otro grupo de ensayos, a tres de los tubos del segundo experimento les adicionamos simultáneamente TSP purificada (triángulos), Eglin (cuadros abiertos), o un anticuerpo monoclonal anti-TSP humana (diamantes abiertos). En un tubo final, colocamos células HL-60 antes del tratamiento con ATRA y adicionamos plasminógeno y Eglin, simultáneamente (círculos). Nuevamente, tomamos 150 µl de cada alícuota a las que se les adicionó el sustrato cromogénico S-2251. Los resultados se expresan en promedio ± 1DS nM del sustrato cromogénico liberado en 8 experimentos en base a una curva de calibración con plasma purificada.

En este experimento se observó que la actividad de la plasmina se incrementa en el sistema con la activación celular y que la TSP y el Eglín la disminuyen significativamente. Además, el anticuerpo anti-TSP regresa el sistema al nivel de actividad de plasmina similar al obtenido con la sola activación celular.

DISCUSION.

Determinar las características más íntimas de la actividad inflamatoria es un punto esencial en la investigación médica moderna. La inflamación puede ser desencadenada por múltiples mecanismos y está presente en diversos procesos fisiológicos específicos como inmunidad y coagulación o fisiopatológicos como leucemia aguda promielocítica, fenómeno isquemia reperfusión, coagulación intravascular diseminada y sepsis.

El fenómeno inflamatorio tiene diversos componentes siendo el celular el más importante por su capacidad de amplificación y mantenimiento de la reacción. El PMN es el elemento inflamatorio principal por su capacidad proteolítica, adhesiva y migratoria que le permiten entrar y abandonar el sitio de lesión inflamatoria e interactuar con diversas moléculas y células. El PMN es una célula que contiene en sus gránulos diversas enzimas mediante las cuales lleva a cabo su función fagocítica. Ya que sabemos que una de las enzimas neutrofilicas más importantes es la EN por su gran actividad proteolítica, se hace importante conocer sus patrones de actividad en un intento por esclarecer sus efectos fisiopatológicos.

De gran importancia es la acción proteolítica de esta enzima sobre FV de la coagulación ya que al ser activado forma un complejo junto con FXa, Ca⁺⁺ y los fosfolípidos celulares para establecer el denominado "complejo de protrombinasa", el cual es capaz de actuar sobre la protrombina para que se convierta en trombina. Ésta representa la principal enzima del sistema de coagulación debido a su acción sobre la molécula de fibrinógeno y la formación de fibrina como elemento principal del coágulo. De esta manera se establece un puente entre inflamación y el sistema de coagulación.

La EN puede ser inhibida por diversas moléculas entre ellas α -2-macroglobulina y TSP. Estos inhibidores son importantes en diferentes situaciones fisiológicas aunque al final modulan, directa o indirectamente, la formación del coágulo. Por otra parte, el PMN también

posee en el interior de sus gránulos TSP la cual es una proteína capaz de realizar diversas funciones mediante sus múltiples dominios ya que uno sólo de ellos efectúa varias funciones incluyendo la interacción con diversas moléculas y células.

Las células HL-60 son una línea celular promielocítica maligna que expresa un solo receptor para la TSP localizado en su dominio HBD. Sin embargo, el PMN maduro expresa los dos receptores que se unen a los dos dominios de la TSP con capacidad de unión a estas células: HBD y TSP-70. Con base en esto, se postuló la hipótesis de que mediante la diferenciación con ATRA de las células HL-60 se lograría la expresión de los dos receptores para TSP y con ello se incrementaría el número de moléculas de TSP en la superficie de estas células. La EN también tiene acción sobre plasminógeno por lo que la activación de esta proenzima daría por resultado la activación de la fibrinólisis dependiente de células. Sin embargo, debido a la acción inhibitoria de TSP sobre EN, la actividad fibrinolítica también debía ser modulada por la TSP en el proceso inflamatorio. Desde este punto de vista, uno de tantos procesos fisiológicos de la TSP puede ser la modulación de la EN, es decir, una disminución de su efecto activador sobre algunos de sus substratos. En este estudio, nosotros evaluamos el efecto de la EN sobre el FV de la coagulación y sobre el plasminógeno. En base a datos previamente publicados, elegimos un modelo celular con células HL-60 para observar los cambios que pudieran sufrir el sistema de coagulación y actividad fibrinolítica mediante la interacción EN-PMN-TSP mediante el tratamiento con ATRA.

Así, después de realizar nuestros experimentos, nuestro estudio mostró que las reacciones de coagulación que ocurren en la superficie de las células HL-60 no tratadas con ATRA son completamente diferentes de las que ocurren en las células diferenciadas con este agente. La disminución significativa de la actividad de EN de las células inmaduras comparada con la

de las células diferenciadas nos permite aseverar que la diferenciación influye en las reacciones de coagulación. Establecimos que este efecto es específico de la EN al utilizar un inhibidor directo de esta enzima y observando que la actividad de la enzima disminuía en presencia del inhibidor. El papel de la TSP en la inhibición de la EN también fue evaluado utilizando a lo largo del estudio saturación de los receptores de TSP sobre la superficie celular (con lo cual la actividad de EN disminuía significativamente), o utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TSP el cual potenciaba las reacciones dependientes de EN.

En general, los mismos resultados se obtuvieron cuando la actividad de la EN se valoró en función de su capacidad de activar el sistema de coagulación o a la fibrinólisis. La activación del FV fue dependiente de todas las variables que anteriormente habíamos determinado para la función de la EN y además también fue dependiente del tiempo de exposición de la enzima a su sustrato. Más aún, los hallazgos fisiológicos pudieron ser demostrados con Western Blot mostrando la proteólisis tanto del FV como del plasminógeno.

Tanto en los experimentos que evaluaron la coagulación como la fibrinólisis se encontró que la activación celular eleva la capacidad proteolítica de la célula. Este evento está mediado por la bien demostrada salida de EN de los gránulos del PMN al exterior luego de la activación de la célula. Esto tiene una implicación fisiopatológica muy importante ya que explica, al menos en cierta medida, el papel del PMN en el proceso inflamatorio. Este se ve magnificado debido al reclutamiento de PMNs lo que conduce a un incremento en la coagulación y fibrinólisis. Por lo tanto, el estudio de las bases moleculares del reclutamiento celular y sus interacciones son de gran significado ya que se podrían postular una serie de estudios subsecuentes para delimitar una probable implicación clínica de estas observaciones.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA³⁹

Cabe mencionar que, como se demuestra en dos de los grupos de experimentos de este trabajo, la TSP es incapaz por si sola de inhibir completamente la actividad de la EN. Esto tiene implicaciones importantes ya que hace necesario recalcar la importancia que tienen todos los mecanismos enzimáticos y la gran complejidad de sus sistemas de modulación. No obstante, y dada la gran inhibición que se logra por ejemplo, al saturar el sistema celular con TSP, es innegable que esta última molécula tiene una gran participación en la regulación de la actividad enzimática del PMN y por lo tanto, del fenómeno inflamatorio.

Aunque el desarrollo de este trabajo se basó inicialmente en una conjetura sin referencias previas, poco a poco se han publicado evidencias que apoyan nuestra hipótesis de trabajo. La última y más poderosa de ellas ha sido publicada recientemente. Utilizando PMNs aislados de sangre periférica, ha sido posible demostrar mediante microscopía confocal que tanto la EN como la TSP se encuentran colocalizadas en la superficie de las células y más aún que la localización es directamente de la EN sobre la molécula de TSP(53). Este hallazgo le da un gran soporte a nuestros resultados ya que asegura el hecho de que la EN es localizada a la membrana celular y que en ese lugar su efecto queda completamente modulada por la TSP.

Finalmente, encontramos que las células HL-60 contienen FV en su interior, un hallazgo del cual no se tenía noticia en la literatura pero que no es del todo sorprendente ya que se sabe que en la mayoría de las células de estirpe mieloide ocurre la síntesis de diversas moléculas hemostáticas conforma avanza su diferenciación. Tal es el caso de las plaquetas ya que estas últimas tienen en su interior FV, FIX y FII los cuales no pueden ser reconocidos en sus progenitores megacariocíticos más primitivos.

Los resultados de este trabajo demuestran que tanto la EN como su modulación por TSP tienen un papel importante en la capacidad proteolítica de las células HL-60 y de las células

que resultan luego de la diferenciación con ATRA. Este efecto proteolítico puede tener implicaciones clínicas muy importante si se consideran algunas entidades patológicas específicas en las que, tanto las células HL-690 como el ATRA están integrados. Por ejemplo, la coagulopatía característica de la leucemia aguda promielocítica puede tener, al menos en parte, su génesis en la activación de la coagulación y la fibrinólisis descrita en este estudio. El uso de TSP o de algún péptido de esta molécula con fines terapéuticos con el fin de inhibir la actividad de la EN podría ser una de las aplicaciones de los resultados de este estudio. Esto no es imposible ya que en nuestro laboratorio se ha logrado sintetizar la secuencia mínima necesaria de la TSP que inhibe a la EN en solución(54). En la actualidad la evaluación de este péptido con un modelo animal de artritis reumatoide está evaluándose. Aunque la aplicación clínica de los resultados de este estudio parecen todavía remotos, sin duda que la información generada es útil para comprender mejor la fisiopatología del PMN en el proceso inflamatorio.

CONCLUSIONES.

Las características de la actividad de la EN en las células HL-60 en relación a su maduración y activación, así como los efectos de la adición de moduladores específicos de la actividad de la EN y de la TSP sobre los sistemas de coagulación y fibrinólisis se sintetizan en los siguientes puntos:

- Las células HL-60 expresan actividad de EN en su membrana. Esta actividad disminuye significativamente cuando la célula es inducida a madurar mediante ATRA como consecuencia probable de un aumento en la unión de TSP a la membrana de las células. Este dato fue parcialmente corroborado cuando observamos que la actividad de EN también disminuye significativamente si las mismas reacciones se llevan a cabo en un sistema con células HL-60 previamente incubadas con TSP, implicando a esta última proteína en la regulación natural de la EN en las células HL-60.
- La modulación de la actividad de EN en la superficie de la membrana de las HL-60 no es total, aún si las células son preincubadas con TSP. De esta manera, se concluye que la modulación de la EN por medio de TSP en la membrana celular es eficiente pero incompleta.
- Utilizando un activador específico para PMNs, se indujo la expresión máxima de EN y TSP en la membrana de las células HL-60. Aunque el patrón de comportamiento de la actividad de la EN fue similar al de las células no activadas, el incremento en la actividad de EN fue significativamente superior. Esto indica que la activación celular permite la expresión máxima de EN y TSP en la superficie celular. Nuevamente, aunque la TSP modula eficientemente la actividad de la EN, esta modulación no es completamente efectiva.

- La actividad de EN en la superficie de las células HL-60 se traduce en la activación del FV de la coagulación a juzgar por la generación de trombina en el sistema. La activación del FV siguió un patrón similar a los encontrados con la sola actividad de EN en el sistema, es decir, su activación disminuía con la maduración inducida por ATRA, con la incubación celular con TSP y en presencia de un inhibidor específico de EN, sin embargo, la activación del factor aumentaba con la activación celular y en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-TSP. Es decir, toda modificación al sistema que implique un aumento en la actividad de TSP se traduce en un aumento en la regulación de la EN y viceversa. Las consecuencias fisiopatológicas de estos hallazgos son relevantes ya que implican una relación estrecha y paralela entre la activación celular, la expresión de TSP, la actividad de EN y la activación del sistema de coagulación.
- Como un hallazgo importante en este estudio, hemos demostrado que las células HL-60 contienen en su interior FV. Este factor se activa y se comporta de manera similar al exógeno cuando las células son sometidas a maduración, activación, incubación con TSP o sus inhibidores y con el inhibidor de la EN.
- Los resultados de los estudios de fibrinólisis demostraron que la EN tiene un comportamiento similar sobre este sistema fisiológico. Es decir, la EN activa al plaminógeno de una manera que depende directamente de la activación celular y que disminuye significativamente con la maduración celular, la incubación con TSP o en presencia de un inhibidor específico para EN. Nuevamente, los resultados de este estudio muestran que la EN tiene un papel importante en la activación de la coagulación en un modelo celular semejante al inflamatorio.

BIBLIOGRAFIA.

1. Weissman G, Smolen JE, Dorchak HM. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N Engl J Med* 1980;303:27-34.
2. Henson PM, Johnson RB Jr. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* 1987;79:669-673.
3. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-372.
4. Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Fliessbach JH, Hajjar KA, Kaminski WE, Jendraschak E, Silverstein RL, von Schacky C. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: Significance of cell-cell interactions. *Thromb Haemos* 1995;74:213-217.
5. Baars JW, De Beer JP, Wagstaff J, Raem D, Eenenberg-Belmer AM, Nauta J, Pinedoi HM, Hack E. Interleukin-2 induces activation of coagulation and fibrinolysis resemblance to the changes seen during experimental endotoxemia. *Br J Haematol* 1992;82:295-301.
6. Fauci AS, Dale DC, Balow JE. Glucocorticosteroid therapy. Mechanism of action and clinical considerations. *Ann Intern Med* 1976;84:304-315.
7. Harlan JM, Killen PD, Harker LA, Stricker GE, Wright DG. Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro. Mechanism of attachment. *J Clin Invest* 1981;68:1394-1403.
8. Brigham KL, Meyrick B. Interactions of granulocytes with the lungs. *Circ Res* 1984;54:623.
9. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537-544.
10. Harlan JM. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* 1985;65:513-525.
11. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-2101.
12. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033-1036.
13. Ten Cate JW, van der Poll T, Levi M, Ten Cate H, van Der Venster SJH. Cytokines: Triggers of clinical thrombotic disease. *Thromb Haemos* 1997;78:415-419.
14. Clark RAF. Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair. *Arch Dermatol* 1988;124:201-208.

15. Giavazzi R, Hart IR. Mononuclear phagocyte adhesion in the presence of laminin. *Exp Cell Res* 1983;146:191-197.
16. Myrovitz H, Wiedeman M, Tuma R. Factors influencing leukocyte adherence in microvessels. *Thromb Haemost* 1977;38:823-832.
17. Marcus AJ. Thrombosis and Inflammation as multicellular processes: significance of cell-cell interactions. *Semin Hematol* 1994;31:261-269.
18. Altieri DC. Inflammatory cell participation in coagulation. *Sem Cell Biol* 1995;6:269-74.
19. Clark RAF. Overview and general considerations of wound repair. In: *The molecular and cellular biology of wound repair*. Eds: Clark RAF, Henson PM, Plenum Publishing Corp, New York, 1988;3.
20. Hansson CK, Jonasson I, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1989;9:567-578.
21. Colvin RB, Johnson RA, Mihm MC, Dvorak HF. Role of the clotting system in cell-mediated hypersensitivity I. Fibrin deposition in delayed skin reaction in man. *J Exp Med* 1973;138:686-698.
22. Varani J, Dixit VM, Fligel SEG, McKeever PE, Carey TE. Thrombospondin-induced attachment and spreading of human squamous carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1986;167:376-390.
23. Ross R. The pathogenesis in atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
24. Silverstein RL, Leung LK, Harpel PC, Nachman RL. Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen. *J Clin Invest* 1984;74:1625-1631.
25. Majluf-Cruz A, Uknis AB, Harris RB, DeLa Cadena RA. Evaluation of consensus sequences of glycosaminoglycans recognition on platelet thrombospondin (TSP1) by a novel heparin binding assay: Their role on TSP1 interactions with human neutrophils (PMNs). *Blood* 1995;86:503a.
26. Bleich HL, Moore MJ. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N Engl J Med* 1980;303:27-31.

27. Lawler JW, Slayter HS, Coligan JE. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* 1978;253:8609-8616.
28. Hogg PJ, Owensby DA, Mosher DF, Misenheimer TM, Chesterman CN. Thrombospondin is a tight-binding competitive inhibitor of neutrophil elastase. *J Biol Chem* 1993;268:7139-7146.
29. Bornstein P. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J.* 1992. 6: 3290-99.
30. Lawler J, Hynes RO. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol* 1986;103:1635-1648.
31. Lawler J, Derick L.H., Connolly JE, Chen JH, Chao FC. The structure of human platelet thrombospondin. *J Biol Chem* 1985;260:3762-3768.
32. Lawler J, Conolly JP, Ferro P, Derick LH. Thrombin and chymotrypsin interactions with thrombospondin. *Ann NY Acad Sci* 1986;485:271-275.
33. Mansfield P, Suchard SJ. Thrombospondin promotes chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1994;153:4219-4229.
34. Wight TN, Raugi GJ, Mumby SM, Bornstein P. Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *J Histochem Cytochem* 1985;33:291-302.
35. Clark RAF. Overview and general considerations of wound repair. In *The molecular and cellular biology of wound repair*. Clark RAF, Henson PM. Eds. Plenum Publishing Corp, New York, 1988:3:325-332.
36. Lahav J. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Bioch Biophys Acta* 1993;1993:1-14.
37. Tuszynski GP, Rothman VL, Murphy A, Siegler K, Knudsen KA. Thrombospondin promotes platelet aggregation. *Blood* 1988;72:109-116.
38. Varani J, Dixit VM, Figiel SEG, McKeever PE, Carey TE. Thrombospondin-induced attachment and spreading of human squamous carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1986;167: 376-390.

39. Lahav J, Lawler J, Gimbrone MA. Thrombospondin interactions with fibronectin and fibrinogen. Natural inhibition in binding. *Eur J Biochem* 1984;145:151-155.
40. Silverstein RL, Leung LLK, Harpel PC, Nachman RL. Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen. *J Clin Invest* 1984;74:1625-1631.
41. Lahav J, Schwatz MA, Hynes RO. Analysis of platelet adhesion with a radioactive chemical crosslinking reagent. Interaction of thrombospondin with fibronectin and collagen. *Cell* 1982;165:253-258.
42. Hogg PJ. Thrombospondin 1 as an enzyme inhibitor. *Thromb Haemost* 1994;72:787-792.
43. Hogg PJ, Owensby DA, Chesterman CN. Thrombospondin 1 is a tight-binding competitive inhibitor of neutrophil cathepsin G. *J Biol Chem* 1993;268:7139-7146.
44. Hogg PJ, Owensby DA, Mosher DF, Mishenheimer TM, Chesterman CN. Thrombospondin is a tight-binding competitive inhibitor of neutrophil elastase. *J Biol Chem* 1993;268:7139-7146.
45. Anonick PK, Yoo JK, Webb DJ, Gonias SL. Characterization of the antiplasmin activity of human thrombospondin in solution. *Biochemistry* 1993;289:903-909.
46. Suchard SJ, Boxer LA, Dixit VM. Activation of human neutrophils increases thrombospondin receptor expression. *J Immunol* 1991;147:651-659.
47. Silverstein RL, Nachman RL. Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J Clin Invest* 1987;79:867-873.
48. Nunes I, Kojima S, Rifkin DB. Effects of endogenously activated transforming growth factor- β on growth and differentiation of retinoic acid-treated HL-60 cells. *Cancer Res* 1999;56:495-499.
49. Stendahl O, Dahlgren A, Hed J. Physicochemical and functional changes in human leukemic cell line HL-60. *J Cell Physiol* 1982;112:217-221.
50. Bollag W. The retinoid revolution. *FASEB J* 1996;10:938-939.
51. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996;10:940-950.
52. de The H. Altered retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996;10:955-960.

3. DeLa Cadena RA, Wishock DA, Colman RW. Colocalization of HNE and TSP on the neutrophil membrane. *Blood* 1998;92(Suppl 1):123a.
4. Hansen K, Harris RB, DeLa Cadena RA. A discrete sequence G812-P824 on platelet thrombospondin (TSP1) contains specific inhibitory activity against human neutrophil elastase (HNE). *Blood* 1996;88 (suppl 1):155a.