



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA TROMBINA SOBRE
LA PROLIFERACIÓN DE LAS CELULAS DEL
EPITELIO PIGMENTADO DE LA RETINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

IVÁN FLORES RAMÍREZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DOCTORA ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ
2013**



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	2
Introducción	3
1. Epitelio pigmentado de la retina	3
1. 1Morfología	3
1. 2 Función	4
2. Vitreorretinopatía proliferativa	6
3. Trombina y proliferación celular	7
4. Inhibidores de la trombina	9
5. Rho GTPasas	9
6. Rock	11
7. MAP cinasas	12
8. Ciclina D1	14
9. c-Fos	15
10. RPE-J	17
Planteamiento	18
Hipótesis	19
Objetivo	19
Materiales y métodos	20
Resultados	
1. La trombina induce proliferación celular en células de la línea RPE-J	25
2. La trombina induce la proliferación de manera específica	26
3. La trombina induce la expresión de proteína y mRNA de c-Fos	27
4. El aumento en la expresión de c-Fos es mediado específicamente por la trombina	29
5. El inhibidor y27632 inhibe la expresión de mRNA de c-Fos	31
Discusión	33
Conclusión	36
Referencias	37

Resumen

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) es un epitelio monoestratificado que forma parte de la barrera hematorretiniana externa cuyas funciones son esenciales para el funcionamiento de la retina neural. En enfermedades proliferativas como la vitreorretinopatía proliferativa, la alteración de la barrera hematorretiniana (BHR) permite que los elementos del suero entren en contacto directo con el EPR, provocando un cambio en su morfología, la pérdida de la polaridad, así como el incremento de la proliferación celular. La trombina, una proteasa de serina/treonina contenida en el suero, activa a los receptores activados por proteasas (PARs) induciendo la proliferación de células de EPR en cultivo primario. C-Fos, un gen miembro de la familia de factores de transcripción AP-1, juega un papel importante en la proliferación a través de la promoción de la expresión de la ciclina D1. Se ha comprobado que la estimulación de células del EPR con trombina induce la expresión bifásica de c-Fos. Mientras que la expresión de c-fos a largo plazo depende de la activación del señalamiento intracelular por las cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) ERK1/2 y por las isoformas convencionales de la Proteína Cinasas C (PKCc), se ha considerado que existe otra vía de señalización involucrada en la expresión temprana de c-Fos. Este trabajo se realizó con el propósito de determinar el posible papel de la Rho GTPasa así como de la cinasa ROCK en la proliferación, a través de la regulación de la expresión de c-Fos en células de la línea celular RPE-J estimuladas con trombina.

Introducción

Epitelio pigmentado de la retina

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) es una monocapa de células pigmentadas que forma parte de la barrera hematorretiniana. La membrana apical del EPR está en contacto directo con los segmentos externos de los fotorreceptores y la membrana basolateral y en contacto con la membrana de Bruch que separa al EPR del endotelio fenestrado de los coriocapilares. El EPR no posee funciones neuronales o fotorreceptoras, pero su integridad es indispensable para el mantenimiento y función de la retina neural y la viabilidad de los fotorreceptores (Marmor, 1998).

Morfología del EPR.

Las células del EPR son cuboides y pequeñas en la región macular (10 a 14 μ en diámetro) mientras que en la periferia de la retina son aplanadas y de mayor tamaño. La membrana de las células del EPR se diferencia en una región apical y una región basolateral. La región apical posee numerosas microvellosidades largas que se interdigitan con los segmentos externos de los fotorreceptores. El citoplasma apical contiene microfilamentos y microtúbulos y también la mayor concentración de gránulos de melanina. La porción media contiene el núcleo y los organelos de la célula (aparato de Golgi, retículo endoplásmico, etc.), así como lisosomas. La membrana basal posee pequeñas invaginaciones complejas que incrementan el área de superficie para la absorción y secreción (Marmor, 1998) (Fig 1).

Cerca de la cara apical de la célula de EPR se encuentra la zonula ocludens, formada por uniones estrechas. Estas uniones restringen el paso de iones y moléculas permitiendo al EPR formar la barrera hematorretiniana externa (la barrera interna forma el endotelio capilar). Además de la zonula ocludens, las células del EPR pueden formar uniones adherentes (zónula adherens) las cuales mantienen la adhesión celular y la estructura en monocapa del epitelio. Otra característica anatómica importante es la presencia de

pigmentos, entre los que destacan la melanina y la lipofuscina (Marmor, 1998; Spaide y Yanuzzi, 1998).

Las regiones apical y basal de la membrana de las células del EPR poseen características funcionales específicas debidas a la distribución diferencial de canales iónicos y receptores. Por ejemplo, la bomba electrogénica (ATPasa) sodio-potasio se localiza en la membrana apical, mientras que el transportador de intercambio de cloruro y bicarbonato se localiza en la membrana basal.

El EPR obtiene su nombre del pigmento melanina que está presente dentro de los gránulos citoplasmáticos llamados melanosomas. Es el primer tejido en el cuerpo en pigmentarse y la melanogénesis continúa en cierto grado a lo largo de la vida (Marmor, 1998).

Función del EPR

El EPR constituye la barrera hematorretiniana externa; la barrera interna está formada, principalmente, por células endoteliales. Uniones estrechas entre células de EPR vecinas y células endoteliales vecinas son esenciales para el control estricto de fluidos y solutos que cruzan la barrera hematorretiniana, así como para la restricción del paso de moléculas tóxicas y componentes del plasma hacia la retina. Por lo tanto la función de sello es esencial para la integridad de la retina (Simó et al, 2010).

Mediante la melanina, contenida en los melanosomas, el EPR absorbe la energía luminosa excesiva, lo que impide el daño fótico de los fotorreceptores; asimismo, el EPR transporta iones, agua y productos metabólicos del espacio subretinal hacia la sangre. Otra de sus funciones es la de transportar nutrientes como la glucosa, el retinol y ácidos grasos de la sangre, hacia los fotorreceptores. De manera importante, el EPR interviene en el fenómeno de la fototransducción en los fotorreceptores a través del intercambio del retinal, el cromóforo del pigmento visual rodopsina, debido a que los fotorreceptores son incapaces de reisomerizar el trans-retinal formado después de la absorción de fotones, a 11-cis-retinal. Para mantener la excitabilidad de los fotorreceptores, el 11-cis-retinal se

libera del EPR y se utiliza, en los fotorreceptores, para re-sintetizar la rodopsina. Este proceso se denomina "ciclo visual" de la retina. Aunado a lo anterior, la conductancia de iones dependiente de voltaje de la membrana apical del EPR, permite estabilizar la composición de iones en el espacio subretinal, el cual es esencial para el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores.

Otra función del EPR, importante para el mantenimiento del proceso visual, es la fagocitosis del extremo apical de los segmentos externos de los fotorreceptores. En las células de EPR, la digestión de los discos fagocitados genera sustancias esenciales como el retinal, mismas que se reciclan a los fotorreceptores para la síntesis de nuevos discos de rodopsina y su incorporación a los segmentos externos desde el segmento interno de las células fotorreceptoras (Marmor, 1998).

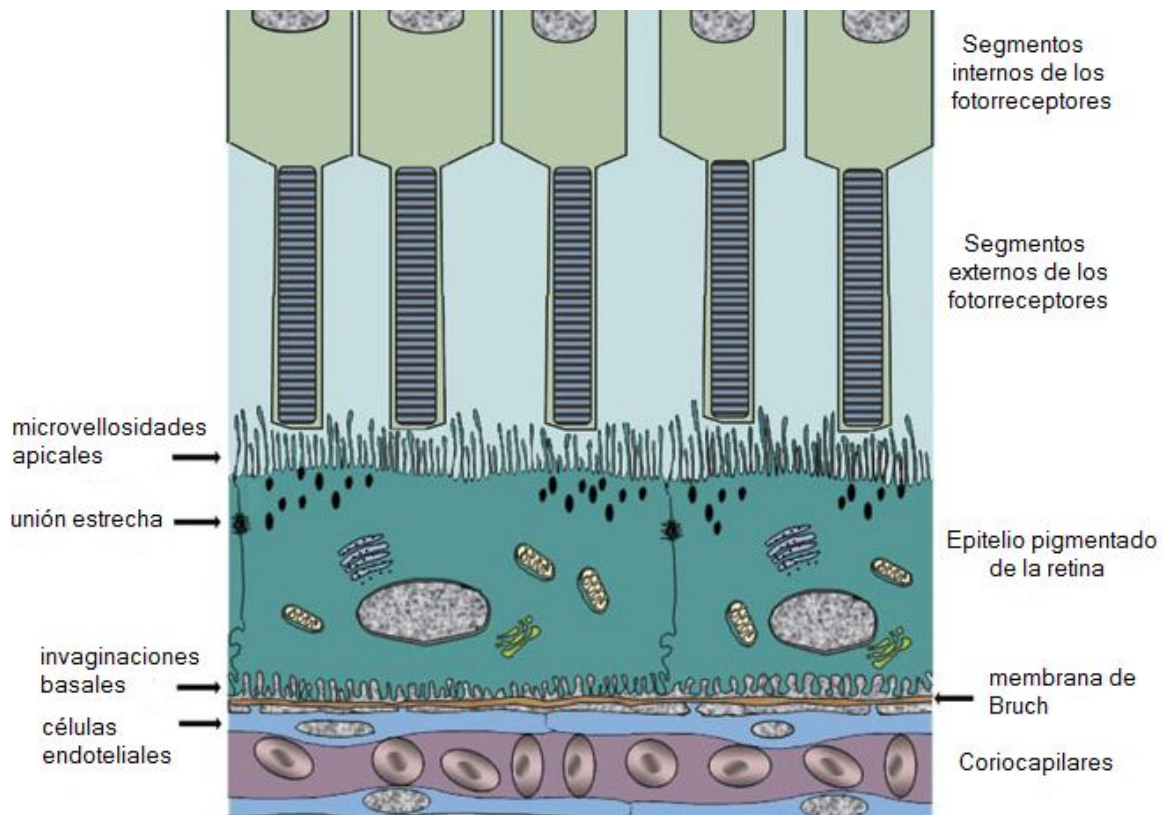


Fig 1. Diagrama de la retina externa ilustrando la naturaleza polarizada del EPR y su relación con los fotorreceptores, la membrana de Bruch y los coriocapilares. Modificado de Sonoda 2009.

Vitreorretinopatía proliferativa

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) se caracteriza por la formación de membranas celulares contráctiles sobre ambas superficies de la retina, constituidas principalmente, por células transformadas de EPR y glía, por lo que se considera a la transformación del EPR como un factor primordial en la patogénesis de la VRP.

La VRP se ha considerado como un proceso de cicatrización amplificado por inflamación. Como consecuencia de un rompimiento de la retina, sobreviene una fase inicial inflamatoria derivada de la ruptura de la barrera hematorretiniana, lo que habilita la migración de las plaquetas a la lesión y la liberación de factores de crecimiento tales como PDGF, TGF-B y EGF. Simultáneamente, se forma una matriz extracelular temporal constituida por fibrina y fibronectina derivadas del suero. Tanto la fibronectina como los factores tróficos y citocinas liberados estimulan la migración celular actuando como elementos quimiotácticos en el sitio de la lesión, mismos que atraen a monocitos capaces de transformarse en macrófagos.

Existen diversos factores de riesgo que favorecen el desarrollo de la VRP; entre ellos, las hemorragias vítreas, la afaquia, el desprendimiento de la retina y, de manera importante, las intervenciones quirúrgicas destinadas a la reparación del desprendimiento de la retina. Sin embargo, todos estos factores tienen en común el rompimiento de la barrera hematorretiniana, lo que permite el paso de células inflamatorias y factores estimulantes a la cavidad vítrea. La sangre actúa tanto como un potente estímulo inflamatorio como una fuente mayor de factores de crecimiento contenidos en el suero (Pastor, 1998).

Trombina y proliferación celular

La trombina, una enzima clave en la cascada de coagulación, es una proteasa de serina /treonina que inicia la activación de las plaquetas y que está involucrada en procesos de inflamación severa. Se genera por el corte proteolítico de la protrombina en dos sitios, mediado por el factor activado X (FXa). Una vez activada, la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina, activa a otros factores en la vía de la coagulación (FV, FVIII, FXIII, la proteína C y el inhibidor de fibrinólisis activable de la trombina) y puede cortar proteínas fuera de la vía de señalización tales como los componentes complemento C3 y C5 (Ma *et al.*, 2011).

Algunos de los efectos de la trombina son consistentes con un papel primario en la cicatrización de heridas y la revascularización que incluye no sólo la formación de coágulos, sino diversos efectos sobre tipos celulares que intervienen en la respuesta sistémica del daño vascular. Las células blanco de los efectos de la trombina incluyen a las plaquetas, células endoteliales y células del músculo liso, además de neutrofilos, leucocitos, neuronas y células gliales. La activación por trombina de un amplio rango de tipos celulares facilita una respuesta coordinada al daño en los vasos sanguíneos, incluyendo la agregación de plaquetas, extravasación de leucocitos, angiogénesis, regeneración de nervios e incluso el inicio de una respuesta inmune controlada (Macfarlane *et al.*, 2001).

Sumado a su papel en la cascada de coagulación, se ha demostrado que la trombina activa distintas vías de señalización en diversos tipos celulares, a través de la activación de una familia de receptores acoplados a proteínas G llamados "receptores activados por proteasas" (PARs) (Parrales *et al.*, 2010). Los PARs se activan por un mecanismo de corte proteolítico irreversible en el cual la proteasa se une al receptor y corta su dominio extracelular amino-terminal. Este corte genera un nuevo extremo amino que funciona como ligando al unirse intramolecularmente al cuerpo del receptor con el fin de iniciar la señalización transmembranal. Los PARs son receptores transmembranales acoplados a

proteínas G y transducen respuestas de señalización de acuerdo con el paradigma clásico establecido para otros GPCRs: la activación de los PARs induce cambios conformacionales en el receptor que promueven la interacción del mismo con proteínas G heterotriméricas (Trejo, 2003).

Se han descrito cuatro miembros de la familia de los PARs: PAR-1, PAR-3 y PAR-4, activados por trombina y PAR-2, activado por tripsina, triptasa y otras proteasas relacionadas con la tripsina. PAR-1 el prototipo de esta familia de GPC, señala a través de Gq1 α , G12/13 α y Gi α , lo que explica la acción pleiotropica de sus ligandos. La activación de Gq por la trombina induce el incremento de la concentración intracelular de inositol trifosfato (IP3) y calcio, y la activación río abajo de la proteína cinasa C (PKC), de la fosfoinositido-3 cinasa (PI3K) y de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs) (Parrales *et al.*, 2010).

En el sistema nervioso central, se ha demostrado que la trombina estimula la proliferación de células gliales de la retina después de la ruptura de la barrera hematorretiniana (Puro *et al.*, 1990) y promueve la expresión de la ciclina E y D1, reguladoras del ciclo celular en neuronas corticales (Rao *et al.*, 2007). En células de EPR, *in vitro*, se demostró que la activación del receptor PAR-1 por la trombina promueve la proliferación celular mediante la activación conjunta de dos vías intracelulares de señalización: PLC- β /PKC y la cascada dependiente de Ras Raf/Mek/Erk. (Parrales *et al.*, 2010; Palma-Nicolás *et al.*, 2008)

La activación de los PARs está acoplada, asimismo, con la inhibición de la adenilil ciclasa, vía proteínas G de tipo Gi y, más recientemente, se identificó el acoplamiento de PAR-1 a la activación de G12/13 aunque la modulación de los efectores río abajo de G12/13 tales como Rho y GEFs por la estimulación de PAR-1 se desconoce en gran medida. Con base en la evidencia descrita, es razonable proponer que la trombina podría estar involucrada en la patogénesis de desórdenes proliferativos tales como la VRP (Parrales *et al.*, 2010)

Inhibidores de la trombina

El diseño original de técnicas para inhibir la acción de la trombina se basó en el estudio de animales hematófagos, que requieren un flujo de sangre libre a través de la inhibición de la coagulación. Debido al papel central de la trombina en la coagulación, la estrategia adoptada por la mayoría de estos animales es inhibir a la trombina mediante pequeñas proteínas multivalentes entre las cuales la mejor caracterizada y más utilizada en la medicina tradicional es la hirudina (Huntington *et al.*, 2003). La hirudina es un polipeptido de 65 aminoácidos con un peso molecular de ~7kDa producido por las glándulas parafaríngeas de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. La estructura terciaria de esta molécula está estabilizada por 3 puentes disulfuro. Su estructura tridimensional revela 3 distintas regiones: un núcleo central (residuos 3-30, 37-46, 56-57), un dedo (residuos 31-36), y un giro (residuos 47-55) (Greinacher *et al.*, 2008). La hirudina inhibe a la trombina mediante la interacción simultánea con el sitio activo y el exosito 1; aunque teóricamente el complejo es reversible, una constante de disociación en el rango de 10^{-14} M la hace prácticamente irreversible (Huntington *et al.*, 2003).

La D-Fe-Pro-Arg clorometil cetona (PPACK) es un inhibidor que fue desarrollado basado en la predicción que la secuencia D-Fe-Pro-Arg pudiera imitar la secuencia del fibrinógeno, sustrato natural de la trombina (Jagabandhu *et al.*, 1995). PPACK forma una unión covalente con la Ser195 y la His57 en el sitio activo de la trombina, impidiendo así su actividad catalítica (Huntington *et al.*, 2003).

Rho GTPasas

Las Rho GTPasas forman una familia de 29 proteínas G monoméricas que regulan el citoesqueleto y otras funciones celulares incluyendo el ciclo celular, la polaridad y la migración celular. Trabajando como "switches" moleculares, las Rho GTPasas existen ya sea en una forma inactiva unida a GDP o en una forma activa unida a GTP. Sólo en su forma activa pueden interactuar con sus diferentes efectores. La expresión diferencial de estos efectores en los diferentes tipos celulares determina la función de la Rho GTPasa.

Los efectores de las Rho GTPasas son muy variados e incluyen moléculas promotoras de la nucleación de actina (N-WASP, WAVE), proteínas adaptadoras y cinasas. El intercambio de GDP por GTP y, por lo tanto, la activación de las Rho GTPasas está catalizado por intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) que actúan río abajo de algunos receptores celulares como receptores de factores de crecimiento, integrinas, receptores de citocinas y cadherinas.

La desactivación de las Rho GTPasas requiere de una actividad de GTPasa intrínseca la cual hidroliza el GTP a GDP. Esta actividad, sin embargo, es muy débil y por lo tanto son necesarias las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), las cuales promueven la función GTPasa de las proteínas Rho.

La familia de las Rho GTPasas que incluye RhoA, Cdc42 y Rac1, estimula la progresión del ciclo celular. Rac1 y RhoA promueven la transición de la fase G1 a la S, mediante el incremento de la concentración de ciclina D1. Sin embargo, las vías moleculares mediante las cuales ejercen esta función aún no están claras y parecen depender del tipo y contexto celular (Karlsson *et al.*, 2009)

Entre los agentes vasoactivos descritos, los mecanismos involucrados en la alteración de la permeabilidad endotelial por la trombina han sido los más extensamente estudiados. Se ha sugerido que el desarrollo de tensión isométrica debida al incremento de la contractilidad de la actomiosina es la causa primaria del rompimiento de la función de barrera del endotelio inducido por la trombina. Se ha demostrado que la contractilidad de la actomiosina inducida por la trombina se inhibe por inhibidores de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y quelantes de calcio, así como por inhibidores de la RhoA/Rho cinasa. RhoA se transloca a la membrana celular y se activa por el tratamiento con trombina. Tanto la inhibición de RhoA con la toxina C3 transferasa o la expresión de la dominante negativa de RhoA, así como la inhibición de su efector inmediato, ROCK (Y-27632) impide el incremento de permeabilidad inducido por la trombina (Wojciak-Stothard B *et al.*, 2002).

ROCK

La Rho-cinasa (ROCK) es un efector de la Rho GTPasa y juega un papel importante en el re-arreglo del citoesqueleto de actomiosina río abajo de Rho. Rock es una cinasa de serina/treonina que pertenece a la familia AGC de cinasas de proteína, estructuralmente relacionadas con las cinasas DMPK y MRCK. Existen dos miembros de las Rho-cinasas, la α /ROCK2/ROK α y la β /ROCK1/ROK β . Las Rho-cinasas están formadas por un dominio catalítico N-terminal, un dominio central de hélice superenrollada y un dominio PH C-terminal interrumpido por una región rica en cistinas. Rho activa a ROCK al unirse a la porción C-terminal de la hélice superenrollada.

Los miembros de las Rho cinasas intervienen en diferentes funciones celulares a través de la fosforilación de sus sustratos específicos. Entre las funciones que llevan a cabo se incluyen:

- Contracción del músculo liso. El tono del músculo vascular liso se regula por la fosforilación de la miosina II en la cadena ligera de la miosina (MLC), mediada por la MLCK dependiente de Ca^{2+} y la MLC fosfatasa (MLCP). Se ha demostrado que la vía Rho/ROCK modula la "sensibilidad al Ca^{2+} " del músculo liso principalmente a través de la supresión de la actividad de la MLCP.
- Formación de fibras de estrés. Las fibras de estrés y las adhesiones focales confieren contractilidad a la célula y están mediadas por la vía de señalización Rho/ROCK. ROCK induce y mantiene las fibras de estrés mediante el incremento de contractilidad inducido tanto por la fosforilación de la MLC como por la estabilización de la F-actina a través de la activación de la LIM cinasa y la fosforilación consecuente de la cofilina.
- Polaridad de la célula. El mantenimiento de la polaridad celular es un requisito indispensable para la persistencia del estado diferenciado de los epitelios; la

alteración de la misma es un factor determinante para la migración celular en procesos invasivos como el cáncer. Varias moléculas y/o estados de activación de proteínas se localizan asimétricamente en las células polarizadas. La actividad de ROCK es necesaria para romper la simetría y/o mantener la polarización.

- Citocinesis. Durante este proceso, las células se dividen en 2 células hijas a través de un aparato contráctil basado en actomiosina conocido como el anillo contráctil. El reclutamiento y la activación de Rho y ROCK se requiere para la progresión de la formación del surco y el desmontaje de los filamentos que aseguran la terminación de este mismo (Amano *et al.*, 2010).

Con el fin de esclarecer las funciones desempeñadas por la Rho cinasa, se han desarrollado inhibidores derivados de la piridina tales como el Y-27632 el cual posee un fuerte efecto inhibidor de ROCK. Originalmente se describió el Y-27632 como un inhibidor inespecífico de ROCK1 y ROCK2 por competir con el ATP por la unión al sitio catalítico. Al respecto, se ha demostrado que el Y-27632 inhibe la transformación celular mediada por RhoA y la invasión celular tumoral. Más recientemente, sin embargo, se demostró que el Y-27632 inhibe también a la PKC y a la PRK2 con una potencia similar a la que ejerce la inhibición de ROCK II (Dong *et al.*, 2010; Davies *et al.*, 2000).

MAPKs

Las cinasas de proteína y otros sistemas de mensajeros forman redes altamente interactivas para lograr que se lleven a cabo las funciones integradas de las células en un organismo. Dentro de las moléculas de señalización en estas redes, la cascada de cinasas conocida como cinasas de proteínas activadas por mitógenos o MAPKs incluye por lo menos a 3 cinasas en serie que culminan en la activación de una MAP cinasa multifuncional, ERK 1/2 . Las MAPKs son componentes mayoritarios de vías que controlan

la embriogénesis, la diferenciación celular, la proliferación, y la muerte celular. (Pearson *et al.*, 2001)

La transmisión canónica de señales a través de estas cascadas se inicia por la activación de una proteína G pequeña, o por interacciones activadoras de componentes con proteínas adaptadoras río arriba de la cascada. Posteriormente, las señales se transmiten río abajo por cinasas citosolicas organizadas en 3 a 5 niveles.

Las cinasas en cada nivel fosforilan y activan a cinasas localizadas en el nivel inferior para permitir una transmisión rápida y regulada de las señales hacia varios blancos de las cascadas.

3 cascadas de MAPK han sido totalmente elucidadas hasta ahora, nombradas de acuerdo con los componentes de su grupo: la cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), la cinasa N-terminal de c-Jun 1-3 (JNK1-3) y p38MAPK α , β , γ , δ . Se ha identificado a otras MAPKs y componentes parecidos a las MAPKs, las cuales no parecen operar dentro de una cascada de cinasas o bien se activan por mecanismos distintos a las MAPKs y por lo tanto no se consideran MAPKs genuinas.

Cada una de las cascadas puede regular procesos celulares distintos y algunas veces traslapados, y normalmente se diferencian por sus actividades fisiológicas principales.

Usualmente la cascada ERK 1/2 juega un papel en la proliferación y la diferenciación, las cascadas JNK y p38 se activan principalmente por estrés celular y por lo tanto se les denomina cinasas de proteína activadas por estrés (SAPKs) (Fig 2), y la cascada de ERK5 parece responder de igual manera a ciertos tipos de estrés así como a señales mitogénicas. Sin embargo, dependiendo de la línea celular y el tipo de estímulo, las distintas cascadas pueden regular funciones no canónicas e incluso opuestas. Por lo tanto, en condiciones particulares, ERK1/2 puede participar en la respuesta a estrés y apoptosis, mientras que JNK puede, ocasionalmente, mediar la proliferación. Es de suma importancia controlar la regulación de estas cascadas, ya que su regulación no controlada suele conducir a enfermedades tales como el cáncer, la diabetes y la inflamación derivada de la respuesta inmune. (Keshet *et al.*, 2010)

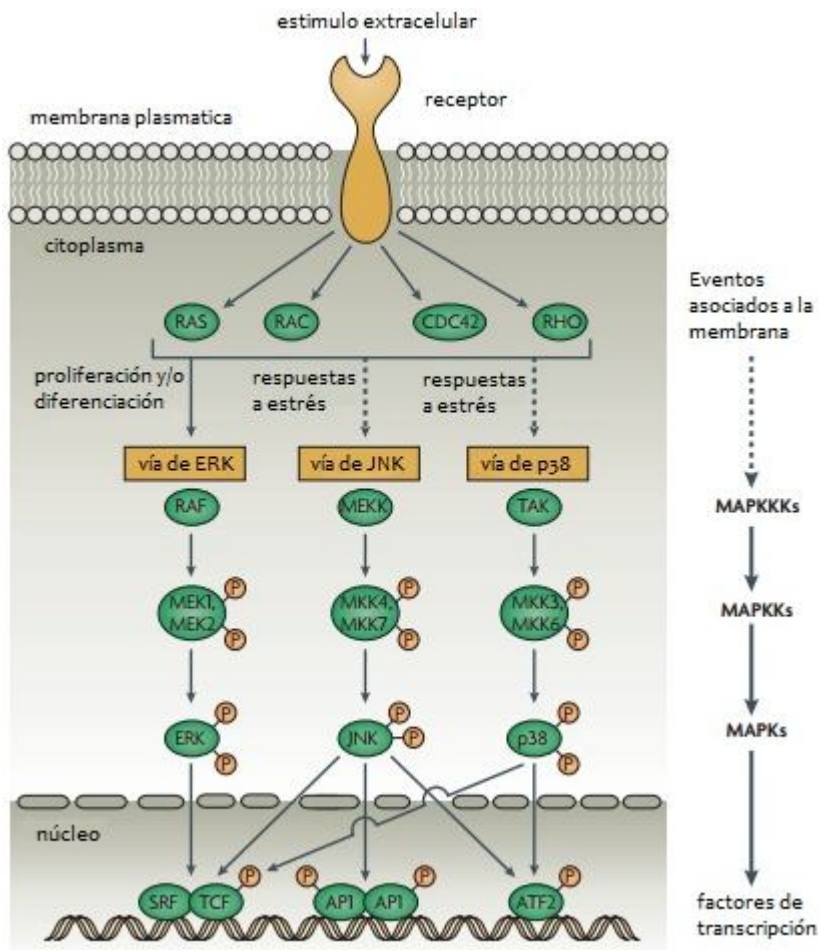


Fig 2. Diagrama de las 3 vías de señalización de las MAPKs en mamíferos. Modificado de Liu 2007.

Ciclina D1

En células de mamíferos, la progresión de la replicación celular a través del ciclo celular está controlada por la formación secuencial, activación y subsecuente inactivación de una serie de complejos ciclina-quinasas dependientes de ciclina (CDKs). El segundo mecanismo de regulación incluye la unión de proteínas inhibitoras específicas a los complejos ciclina-CDKs. El gen de la ciclina D1 codifica para una subunidad del complejo holoenzimático cdk4 y cdk6, que fosforila e inactiva la proteína supresora de tumores pRB (Tashiro *et al.*, 2007).

En su forma activa, Rb está hipofosforilada y forma un complejo inhibitor con un grupo de factores transcripcionales conocidos con E2F-DP, controlando así la transición de la fase G1 a S durante el ciclo celular. La activación de Rb está modulada por la fosforilación secuencial del complejo ciclina D/CDK4 y ciclina E/CDK2. Cuando Rb está parcialmente fosforilada por las CDKs 4 y 6, permanece unida a E2F-DP, pero este factor de transcripción aun es capaz de transcribir genes como el de la ciclina E, la cual se une a CDK2; este complejo activo fosforila totalmente a Rb que, al separarse del complejo E2F-DP activa a los factores de transcripción E2F resultando en la activación de numerosas proteínas involucradas en la fase S (Schwartz *et al.*, 2005).

La señalización mitogénica de una variedad de señales de crecimiento está mediada por la vía de Raf/Mek/Erk, PI3K y PKC cuyo punto final es la estimulación de la expresión de la ciclina D1 (Schwartz *et al.*, 2005; Parrales *et al.*, 2010). La activación de PAR-1 por la trombina estimula la cascada de las MAPKs. Entre los miembros de la familia de las MAPKs, ERK 1/2 se ha asociado, típicamente, con la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación. El promotor del gen de la ciclina D1 contiene secuencias de unión para la familia de factores de transcripción AP-1, CREB y NF- κ B. Entre estos factores, se ha demostrado que la regulación de la expresión dependiente de ERK 1/2 de c-Fos y c-Jun y su unión al DNA requiere de la señalización de PI3K/PDK1/Akt. Se ha demostrado que, particularmente, las isoformas β 1 y β 2 de la PKC γ inducen la expresión de c-Fos así como la activación transcripcional de su gen (Parrales *et al.*, 2010).

c-Fos

c-Fos pertenece a la familia de factores de transcripción Fos la cual incluye a FosB, Fra-1 y Fra-2 así como a FosB2 y deltaFosB2, las variantes del empalme alternativo de FosB mismos que, junto con los miembros de la familia de Jun (c-Jun, JunB y JunD), forman el grupo de proteínas AP-1 que, después de dimerizarse se unen a los llamados elementos de respuesta a TPA (TRE) en el promotor de genes blanco.

Los miembros de la familia de Fos no son capaces de formar homodímeros, pero forman heterodímeros con miembros de la familia de Jun, dando origen a varios complejos activadores o represores de la transcripción con distintas propiedades bioquímicas. Estudios in vitro han demostrado que los heterodímeros Jun-Fos son más estables y tienen una mayor fuerza de unión con el DNA que los homodímeros Jun-Jun.

Todas las proteínas AP-1 poseen una región "cierre de leucina" para la dimerización y unión al DNA. Mientras que c-Fos y FosB poseen un dominio de transactivación C terminal, y Fra-1, Fra-2 y FosB2 carecen de esta región (Milde-Langosch, 2005).

Diferentes tipos de estímulo inducen la transcripción de c-Fos de manera rápida y transitoria. Diversos elementos cis median la inducción de c-Fos. Proximal a la caja TATA de c-Fos se localiza un elemento de respuesta a cAMP (CRE) al que se enlaza CREB o proteínas ATF, que median la inducción de c-Fos vía cAMP y vías de señalización dependientes de Ca^{2+} en respuesta a neurotransmisores u hormonas polipeptídicas.

Otro elemento cis que regula la transcripción de c-Fos es el potenciador sis-inducible (SIE), reconocido por los factores de transcripción STATs (transductor de señales y activador de la transcripción), activados y translocados al núcleo como respuesta a señales que activan a las cinasas de tirosina JAK. Un tercer elemento es el elemento de respuesta a suero (SRE), reconocido por un dímero de factores de respuesta al suero (SRF) que reclutan a los factores del complejo monomérico ternario (TCFs) (Fig 3); estos últimos son importantes mediadores de la inducción de c-Fos por una amplia variedad de estímulos extracelulares.

La fosforilación estimulada por mitógenos de Elk-1, uno de los numerosos TCFs, está mediada por el grupo ERK de MAPKs. Los sitios fosforilados por ERK residen en el dominio de activación carboxilo-terminal de Elk-1 y funcionan como reguladores positivos. Sitios fosfoaceptores similares están presentes en otros TCFs en los cuales ERK es responsable de la estimulación de la fosforilación y la actividad. Sin embargo, el SRE también media la inducción de c-Fos por estímulos tales como la radiación UV y la IL-1, ninguno de los cuales induce una activación considerable de ERK; más bien, estos estímulos activan a

otros dos grupos de MAPKs, las JNKs y p38. Miembros de ambos grupos son capaces de fosforilar a Elk-1 en un subgrupo de sus sitios estimulatorios, potenciando así su actividad transcripcional e induciendo la transcripción de c-Fos (Karin, 2002).

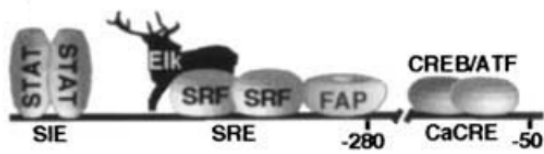


Fig 3. Promotor de c-Fos. Modificado de Bebien, 2003

RPE-J

La línea celular RPE-J de epitelio pigmentado de la retina de rata fue creada mediante infección con el virus SV-40: a la temperatura permisiva de 33°C se comporta como una línea celular inmortalizada, cuando son cultivadas en filtros de nitrocelulosa cubiertos con una delgada capa de matrigel en la presencia de ácido retinoico por 6 días a 33°C y cambiados a una temperatura no permisiva de 40°C estas células adquieren un fenotipo de EPR diferenciado y polarizado (Nabi *et al.*, 1993).

Planteamiento

Se ha demostrado que la trombina induce la expresión del mRNA y proteína de c-Fos en células de EPR en cultivo primario de manera bifásica, con máximos a los 15 minutos y a las 2 horas. La expresión rápida de la proteína de c-Fos depende de la actividad de ERK, el incremento tardío en la expresión de mRNA y proteína a los 120 minutos requiere de la activación tanto de ERK 1/2 como de las PKC α , sin embargo, la expresión temprana de mRNA no depende de la actividad de ERK 1/2 o de las PKC α . Se demostró, asimismo, que la activación de estas enzimas induce el incremento de la expresión de ciclina D1, así como de la proliferación celular. La demostración de que la activación de ERK/PKC α induce el incremento rápido de la proteína de c-Fos pero no regula la expresión del mRNA, ha llevado a la conclusión de que la expresión rápida del mRNA y de la proteína de c-Fos inducidos por trombina son procesos independientes, controlados diferencialmente por, al menos, dos vías de señalización (Parrales et al., 2009)

La Rho GTPasa fue identificada, originalmente, como un regulador de la organización de la actina del citoesqueleto; sin embargo, también ha sido relacionada con la regulación de la expresión de c-Fos, a través del elemento de respuesta a suero (SRE) localizado en la región promotora de este gen. Se ha demostrado que ROCK, el efector inmediato de Rho, estimula la expresión de c-jun, mediante la activación de la cinasa de c-jun (JNK), actividad que es independiente de la habilidad de ROCK para promover la polimerización de actina. Por lo tanto la vía Rho/ROCK no sólo regula el citoesqueleto, sino también la expresión de genes involucrados en la proliferación celular (Fukushima *et al.*, 2005), por lo que esta vía pudiera estar involucrada en la vía de señalización que da como resultado la expresión de c-Fos.

Hipótesis

La trombina promueve la proliferación en células de la línea RPE-J mediante la activación de la vía de señalización que da como resultado la expresión de c-Fos. En esta vía puede estar involucrada Rho y su efector inmediato la cinasa ROCK.

Objetivos

1-Establecer la línea celular de EPR humano, RPE-J, como un modelo para el estudio de los mecanismos que controlan la proliferación del EPR inducida por la trombina. Se analizará el efecto de la trombina sobre la expresión de c-fos.

2- Empleando las células RPE-J en cultivo, se analizará la intervención de la proteína G monomérica Rho y de su efector inmediato, la cinasa ROCK, en la vía de señalización que promueve la expresión c-Fos inducida por la trombina.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Todos los experimentos se llevaron a cabo en cultivos confluentes de células RPE-J. Las células se suspendieron en medio MEM con 4% de suero fetal de bovino (FBS), y se sembraron en cajas multipozos de 6 a una densidad aproximada de 100, 000 células por pozo. Los cultivos se mantuvieron por 24 horas en un incubador con inyección de CO₂ (5%) en medio MEM con 4% de suero, posteriormente el medio se substituyó por medio Opti-MEM sin suero y los cultivos se incubaron durante otras 24 horas con el fin de sincronizar las células para posteriormente realizar los experimentos.

Ensayo de MTT

La proliferación celular se midió por medio del método de reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Se sembró a las células en placas de cultivo con 96 pozos, a una densidad aproximada de 5000 células por pozo. Posteriormente, las células se privaron de suero, tanto con el fin de sincronizar la división celular, como para eliminar el efecto de factores tróficos contenidos en el suero, que podrían contribuir a la expresión de los genes de interés y/o la proliferación. Después de incubar por 24 horas a 33°C en medio Opti-MEM sin suero, se estimuló a las células con diferentes concentraciones de trombina (0.5 U/ml, 1U/ml, 2U/ml y 4U/ml). Los experimentos se hicieron por triplicado y, como control, se utilizaron pozos de cultivo de la misma placa, a los que no se estimuló con trombina. Las células se incubaron por 24 horas a 37°C; posteriormente, y según las indicaciones del fabricante las células fueron incubadas con el Mtt (Cell Titer 96° Aqueous One Solution Reagent) a 37°C, la absorbancia de las muestras se midió en un lector de microplacas (Opsys MR, DYNEX Technologies) después de 30 y 45 min a una longitud de onda de 450 nm y se corrigió el fondo; la densidad óptica de cultivos no estimulados se estableció arbitrariamente como el 100% de proliferación (control)

Estimulación con trombina

Las células se incubaron por 24 horas en medio MEM con suero; posteriormente, el medio se cambió por medio Opti-MEM sin suero y las células se incubaron por 24 horas adicionales a 37°C después de las cuales, se estimuló con 2 U/ml de trombina en 1 ml de medio Opti-MEM sin suero a los siguientes tiempos: 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 8 horas.

Lisis de células

Pasadas las 8 horas, se eliminó el medio, se añadió 100 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM; pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1%, Chaps al 1%, SDS 10%, NP-40 al 0.5% y albúmina de bovino 0.1%) y 100 µl de buffer de carga (Tris-HCl 0.75 M; pH 8.8, SDS 5%, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.01%), las células fueron lisadas y colocadas en tubos de 1.5 ml, se les añadió 20 µl de β-mercaptoetanol a las muestras y se hirvieron a 93°C por 10 min.

Western Blot

La mezcla de proteínas en las muestras se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5% por 210 min a 55 mV; posteriormente, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Immobilon, Millipore) durante 10 horas a 60 mV. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en TTBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; NaCl 50 mM, Tween 20 al 0.05%) para eliminar el pegado inespecífico de los anticuerpos, y se lavaron 3 veces con TTBS por 5 min.

Para la inmunodetección, se utilizó anticuerpo anti c-Fos (Calbiochem) y anti GAPDH (Cell Signalling), a una concentración de 1: 500 y 1: 5000 respectivamente en TTBS por 24 horas. Posteriormente se hicieron 5 lavados de 5 min con TTBS, se añadió anticuerpo secundario, en el caso de c-Fos su concentración fue 1: 2000 y para GAPDH fue 1: 10 000, y se lavó 5 veces por 5 min con TTBS. Posteriormente, se reveló la película utilizando un sustrato quimioluminiscente (Millipore).

Las películas fueron digitalizadas utilizando un sistema Alpha Digi-Doc (Alpha-Innotech,

San Leandro, CA) y los análisis densitométricos fueron realizados utilizando el software v4.6 de Quantity One de Biorad.

Extracción de RNA

Se siguió el procedimiento descrito de estimulación: 2 U/ml de trombina y los mismos intervalos de tiempo, hasta 8 horas. Se eliminó el medio, se añadió 1 ml de Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA) por 2 min; las células se colectaron y las muestras se mantuvieron en congelación hasta su uso.

Las muestras se descongelaron y se añadió 200 µl de cloroformo, se agitaron usando el vortex 4 veces con intervalos de 5 min entre cada una, los tubos se centrifugaron durante 30 min a 12 000 g a 4°C, se recuperaron los sobrenadantes. Finalmente se añadió 500 µl de isopropanol. Las muestras se congelaron.

Las muestras se descongelaron de nuevo y se centrifugaron 15 min a 12000 g, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 ml de alcohol al 80%; se centrifugaron de nuevo 5 min a 7500 g, se vació el sobrenadante y de nuevo se centrifugaron 5 min a 7500 g, se quitó el sobrenadante y se resuspendió el RNA en 10 µl de H₂O DEPC.

Electroforesis y cuantificación de RNA.

Con el fin de observar la calidad del RNA se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, se hicieron alícuotas de las muestras con 1 µl de la muestra, 5 µl de Glicerol y 4 µl de H₂O DEPC. Las muestras se corrieron 45 min a 60 mV.

Se hicieron alícuotas de las muestras originales para su cuantificación conteniendo 1 µl de la muestra y 3 µl de H₂O DEPC, las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific) y posteriormente se calculó el RNA total.

RT-PCR

Se hicieron alícuotas de las muestras originales a una concentración de 100 ng/µl en H₂O DEPC. La retrotranscripción del mRNA se realizó utilizando oligonucleotido dT (1 µl) (500 µg/ml), DTT (10 mM) y dNTPs (0.4 mM) en el buffer recomendado por el fabricante (50

mM de Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM de KCl y 3mM de MgCl₂), y se añadió 8.25 µl a nuevos tubos que contenían 1 µl de la alícuotas cada uno. La retrotranscripción se realizó en un termociclador en 3 fases, una de 10 min a 80° C, una de 42°C durante 70 min, alcanzada esta temperatura se añadió 0.5 µl de enzima retrotranscriptasa reversa (MMLV-RT Invitrogen) a cada tubo y finalmente una fase de 75° C durante 10 min.

Se añadió 11 µl de H₂O DEPC a cada tubo, se realizó una PCR utilizando: MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (0.4 mM), oligos forward (0.4 mM) y reverse (0.4 mM) específicos de c-Fos y β-actina y Taq DNA polimerasa (2.5 U) en el buffer recomendado por el fabricante (20 mM de Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM de KCl).

Para la amplificación las muestras se sometieron a 95°C 5 minutos, y posteriormente a 30 ciclos con el protocolo siguiente: 95°C, 30 segundos; 60°C 30 segundos y 72°C 30 segundos. Posteriormente, se añadió 5 µl de colorante LB3 a las muestras y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% durante 45 min a 60 mV, el gel fue digitalizado utilizando un sistema Alpha Digi-Doc (Alpha-Innotech, San Leandro, CA) y los análisis densitométricos fueron realizados utilizando el software v4.6 de Quantity One de Biorad.

Gen	Secuencia
c-Fos	Forward 5'-GCTCGTC GTCGACAACGGCT-3' Reverse 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'
β-actina	Forward 5'-AGATACGCTCCAAGCGGAGA-3' Reverse 5'-CAGTCAAGTCCAGGGAGGTC-3'

Tabla 1. Oligonucleotidos utilizados.

Especificidad

Efecto de inhibidores de la trombina

Se utilizaron los inhibidores específicos de la trombina PPACK e hirudina a concentración 2.5 µl/ml y 2 µl por µl de trombina, respectivamente, se realizó el mismo proceso de cultivo de células y al tercer día se pre incubo la trombina junto con los inhibidores por media hora en una incubadora a 37°C 5% CO₂, posteriormente las células se estimularon

durante 15 min, y finalmente se lisaron.

Se obtuvieron muestras para realizar una RT-PCR y western blot con los procedimientos antes mencionados.

Inhibición de ROCK

Se utilizó el inhibidor Y-27632; en un estudio previo se observó que este inhibidor a concentración 5 μM es capaz de bloquear la fosforilación de la MLC mediada por ROCK (Ruiz-Loredo, et al, 2011) por lo que el y-27632 se utilizó a esta concentración. Se repitió el mismo procedimiento de inhibición, esta vez se pre incubo durante media hora la trombina con el inhibidor a concentración 5 y 10 μM , las células se estimularon durante 15 min y posteriormente fueron lisadas. Se repitieron los mismos procedimientos de RT-PCR y western blot antes mencionados para estas muestras.

Resultados

1. La trombina induce proliferación celular en células de la línea RPE-J

Se midió la proliferación celular de la línea RPE-J inducida por la trombina a diferentes concentraciones por medio del método de reducción del MTT, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos, se trabajaron diferentes densidades celulares por pozo (2500 y 5000), y se utilizó suero fetal bovino al 10% como control positivo; la trombina induce proliferación celular de manera dosis dependiente. (Fig 4 y 5)

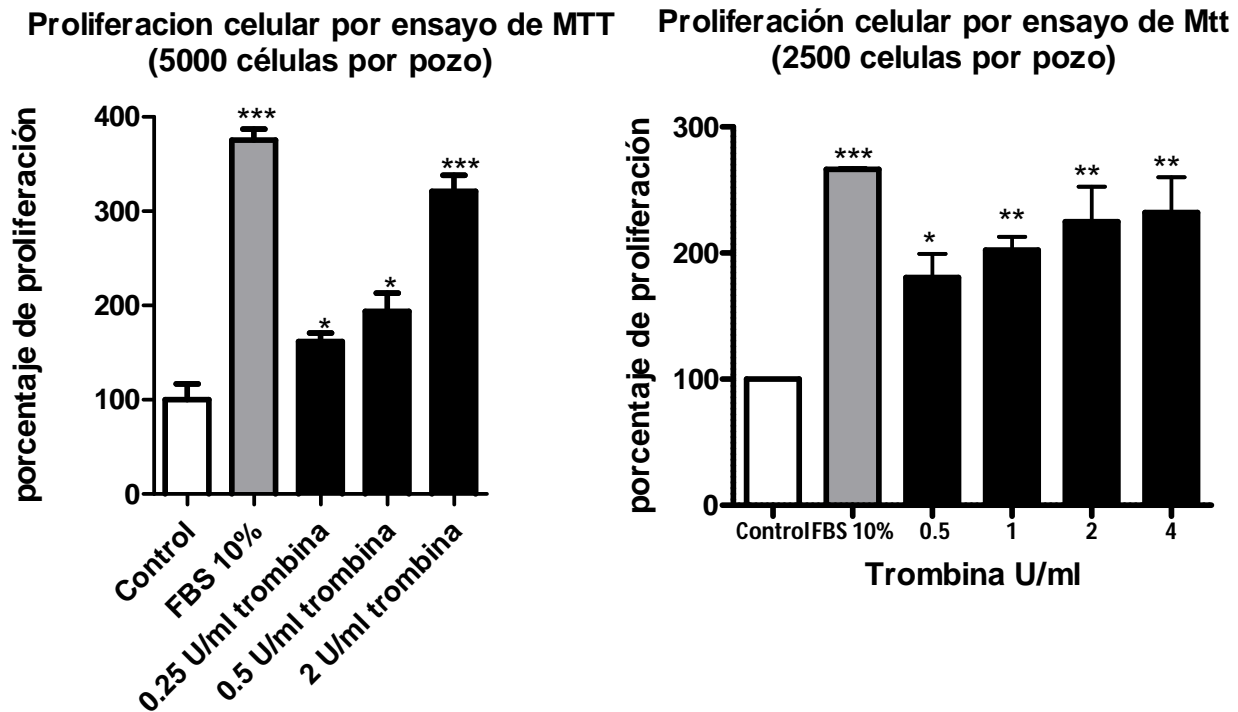


Fig 4 y 5. Inducción de la proliferación por la trombina a diferentes concentraciones en células de RPE-J en cajas multipozo de 96 utilizando diferentes densidades celulares, los resultados corresponden a la media de tres experimentos \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$, t de Student, respecto al control.

2. La trombina induce la proliferación de manera específica

Con el fin de conocer si el efecto proliferativo en las células de EPR está mediado específicamente por la trombina, se utilizaron los inhibidores directos de la trombina PPACK e hirudina. Se utilizaron células estimuladas con trombina a una concentración de 2 U/ml como control positivo. Se observó una disminución significativa y casi total en el aumento de la proliferación con respecto a las células estimuladas únicamente con trombina y no se observó efecto alguno sobre la proliferación en células estimuladas únicamente con hirudina y PPACK, lo que indica que este efecto sobre la proliferación celular es mediado específicamente por la trombina.

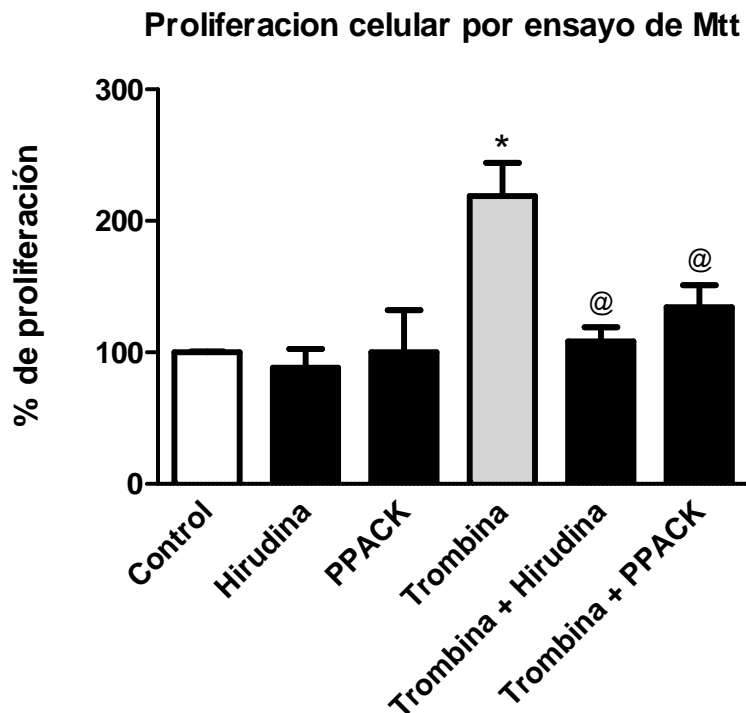


Fig 6. Efecto de la hirudina (2 μ l/ μ l de trombina) y PPACK (2.5 μ l/ml), sobre el aumento en la proliferación inducido por la trombina a concentración de 2U/ml mediante el método de oxidación de Mtt. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos \pm DE. * $p < 0.05$, t de Student, respecto al control. @ $p < 0.05$, t de Student, respecto a las células estimuladas con trombina.

3. La trombina induce la expresión de proteína y mRNA de c-Fos.

Para analizar el efecto de la trombina sobre la expresión de c-Fos se cuantificó la proteína de este gen a lo largo de 8 horas estimulando las células con 2 U/ml de trombina, los resultados muestran 2 aumentos máximos de expresión a los 15 y a los 120 min, sin embargo, la diferencia entre el control y el primer aumento es mayor que con el segundo aumento (Fig 7), estos resultados concuerdan con lo observado en células de EPR en cultivo primario donde la trombina estimula la expresión de proteína de c-Fos de manera bifásica.

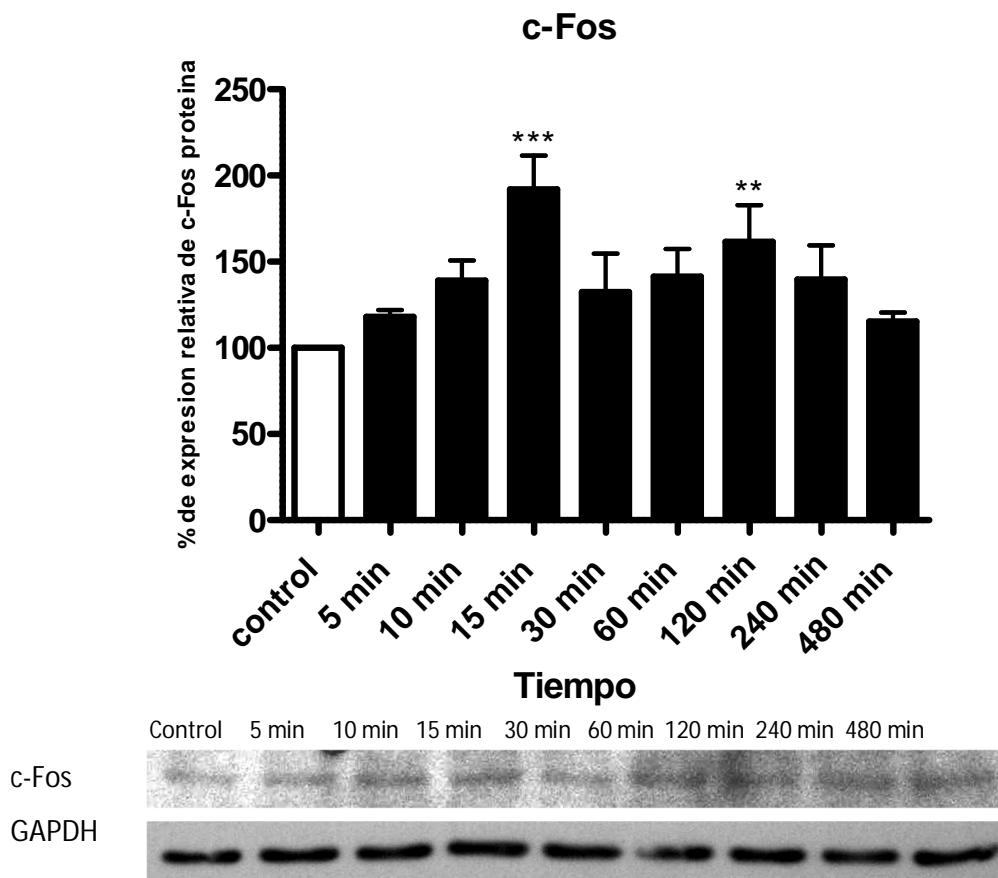


Fig 7. Expresión de proteína de c-Fos. Mediante western blot se cuantificó la expresión de de c-Fos inducida por trombina (2 U/ml) en RPE-J a lo largo de 8 horas. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm DE. , **p < 0.01 *** P < 0.001, t de Student, respecto al control.

Asimismo se analizó el efecto de la trombina sobre la expresión de mRNA de c-Fos, las células fueron estimuladas con 2 U/ml de trombina a lo largo de 8 horas. Los resultados muestran un aumento máximo en la expresión de mRNA a los 30 min, sin embargo, hay una diferencia significativa con el control desde los 15 min y a los 60 min, posteriormente la expresión regresa a un nivel basal (Fig 8).

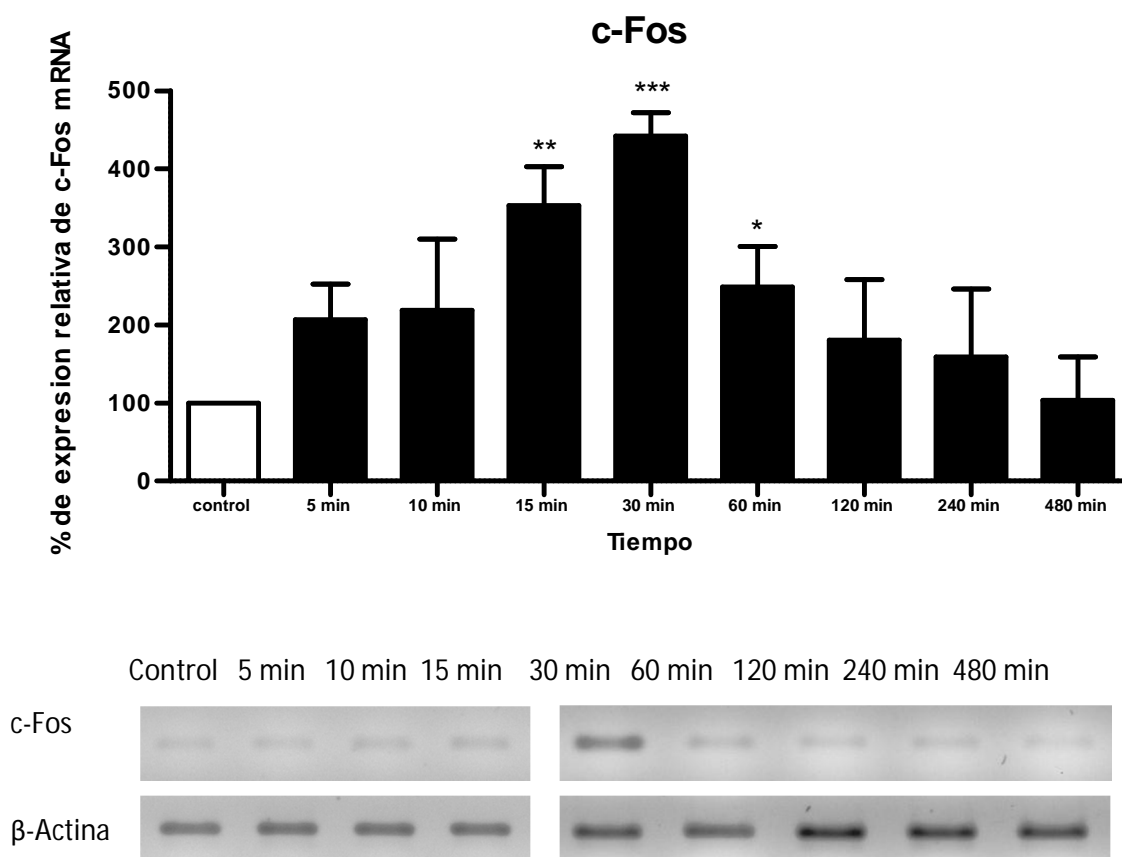


Fig 8. Expresión de mRNA de c-Fos. Se realizó una RT-PCR para cuantificar la expresión de mRNA de c-Fos inducida por trombina a lo largo de 8 horas. Los datos fueron normalizados utilizando β -actina como control de carga. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, t de Student, respecto al control.

4. *El aumento en la expresión de c-Fos es mediado específicamente por la trombina*
 Para determinar si este efecto sobre la expresión de mRNA y proteína de c-Fos es específico de la actividad de la trombina nuevamente se inhibió esta proteasa con hirudina y PPACK. Las células se estimularon con trombina durante 15 min ya que a este tiempo se observó la mayor expresión en proteína (Fig 7) y un aumento significativo en mRNA (Fig 8). Se utilizó el mRNA de células estimuladas con 2 U/ml de trombina como control positivo. El estímulo de la expresión del mRNA de c-Fos inducido por la trombina disminuyó significativamente al inhibir la trombina con hirudina y PPACK demostrando así que este efecto está mediado, específicamente, por la trombina. Al estimular las células únicamente con los inhibidores se mostró un ligero incremento en la expresión de mRNA de c-Fos, sin embargo, estos aumentos no muestran diferencia significativa con respecto al control (Fig 9)

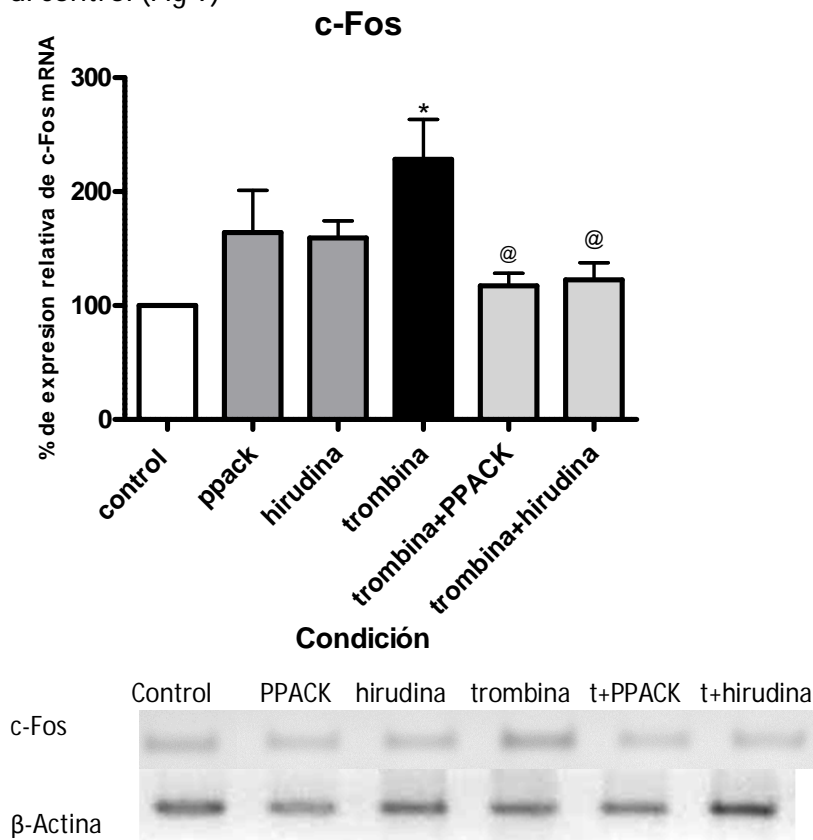


Fig 9. Efecto de la hirudina (2 μ l/ml de trombina) y PPACK (2.5 μ l/ml) sobre la inducción de la expresión de mRNA de c-Fos mediada por la trombina a los 15 min. Los datos fueron normalizados utilizando β -actina como control de carga. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm DE. * $p < 0.05$, t de Student, respecto al control. @ $p < 0.05$, t de Student, respecto a las células estimuladas con trombina

Al igual que lo observado en la expresión de mRNA, la expresión de proteína de c-Fos disminuyó de manera total al inhibir la trombina con hirudina y PPACK, como control positivo se utilizaron células estimuladas con 2 U/ml de trombina (Fig 10)

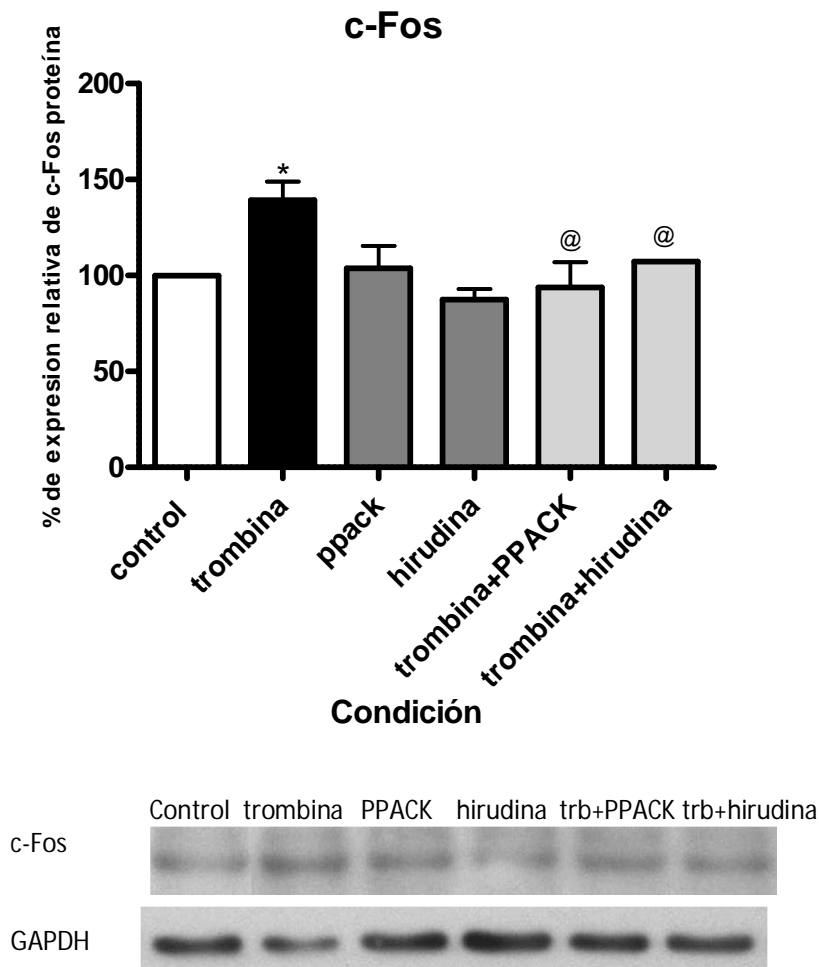


Fig 10. Efecto de la hirudina (2 μ l/ml de trombina) y PPACK (2.5 μ l/ml) sobre el aumento en la proteína de c-Fos inducido por la trombina (2 U/ml) a los 15 min. Los datos se normalizaron utilizando GAPDH como control de carga. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm DE. * $p < 0.05$, t de Student, respecto al control, @ $p < 0.05$, t de Student, respecto a las células estimuladas con trombina.

5. El inhibidor y27632 inhibe la expresión de mRNA de c-Fos

Para conocer si la vía Rho/ROCK está involucrada en la vía de señalización que da como resultado la expresión de mRNA de c-Fos, se inhibió a la cinasa ROCK con el uso del compuesto Y-27632 a concentraciones 5 y 10 μM , se utilizó el mRNA de c-Fos de células estimuladas con trombina (2 U/ml) como control positivo. El y-27632 inhibió de manera significativa pero no total la expresión de mRNA de c-Fos a concentración 10 μM , sin embargo a concentración 5 μM no tuvo ningún efecto. Las células estimuladas únicamente con el inhibidor en sus diferentes concentraciones no sufrieron un efecto significativo sobre la expresión del mRNA de c-Fos.

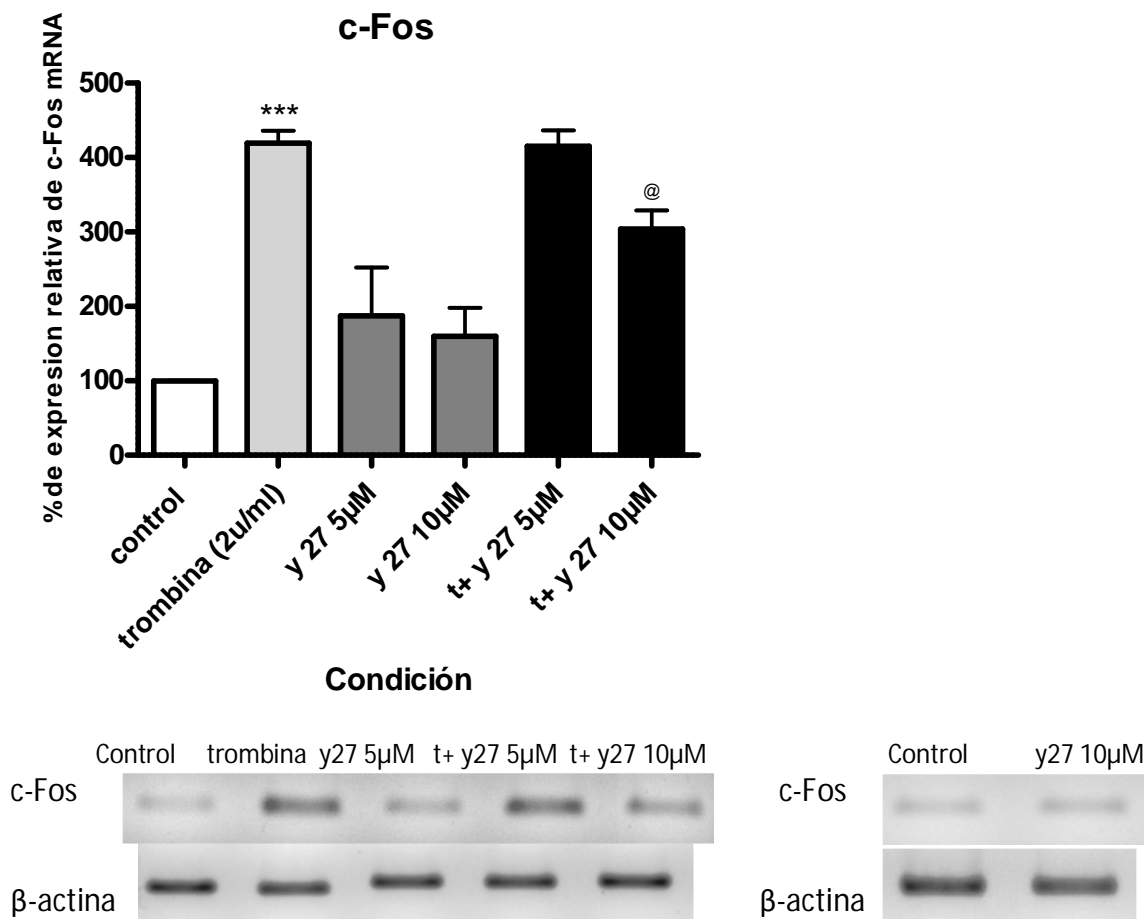


Fig 11. Inhibición de ROCK con el y27, se muestra el efecto del inhibidor de ROCK a concentración 5 y 10 μM sobre el aumento de mRNA de c-Fos inducido por trombina a los 15 min realizado mediante RT-PCR. Los datos se normalizaron utilizando β -actina como control de carga. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm DE.. *** P < 0.001, t de Student, respecto al control. @ p < 0.05, t de Student, respecto a las células estimuladas con trombina.

De igual manera se analizó el efecto del y-27632 sobre el aumento de la expresión de proteína de c-Fos inducido por la trombina, se utilizaron células estimuladas con trombina (2 U/ml) como control positivo. A diferencia de lo observado en el mRNA, la expresión de la proteína de c-Fos inducida por la trombina no mostró una disminución con el uso del inhibidor a ninguna de las concentraciones utilizadas. Las células estimuladas únicamente con el inhibidor no mostraron efecto alguno en la expresión de proteína de c-Fos (Fig 12).

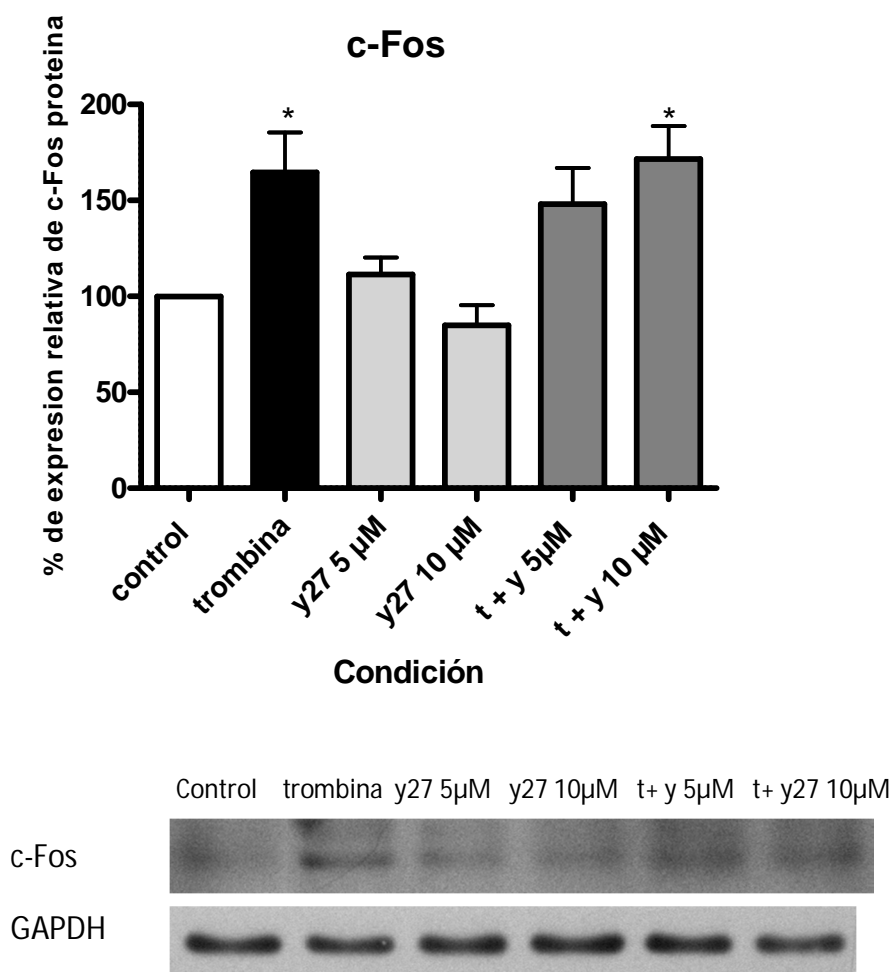


Fig 12. Se utilizó el y-27632 a concentración 5 y 10 μM para ver su efecto sobre el aumento en la proteína de c-Fos inducido por trombina mediante western blot. Los datos se normalizaron utilizando GAPDH como control de carga. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes ± DE. * p < 0.05, t de Student, respecto al control.

Discusión

Se ha demostrado que la activación de PAR-1 por la trombina promueve la progresión del ciclo celular y la proliferación de las células de EPR debido al incremento de la expresión de c-Fos y ciclina D1 (Parrales *et al.*, 2010). Los resultados demuestran que en la línea celular RPE-J la trombina también induce la proliferación celular de manera específica y dosis dependiente.

El promotor del gen de la ciclina D1 contiene elementos consenso para la familia de factores de transcripción AP-1, CREB y NF- κ B. En células de EPR en cultivo primario se demostró que la trombina juega un papel en la expresión de c-Fos, ya que induce la expresión bifásica de proteína y mRNA de c-Fos a los 15 y a los 120 min (Parrales *et al.*, 2010). En células de la línea RPE-J la trombina induce la expresión de proteína de c-Fos de manera bifásica a los 15 y a los 120 min; sin embargo, la expresión de mRNA de c-Fos inducida por la trombina muestra sólo un máximo de expresión a los 30 min. Se sabe que sumado a su cinética rápida de activación, la respuesta transcripcional de genes de respuesta inmediata es usualmente transitoria y, particularmente para Fos, la expresión máxima se alcanza a los 30 – 60 min después de la estimulación, con un regreso subsecuente a su nivel basal de expresión después de 60- 90 min (O'Donnell *et al.*, 2012).

La expresión de mRNA y proteína de c-Fos inducidas por trombina a lo largo de 8 horas en células de RPE-J demuestra que este gen de respuesta inmediata como se ha comprobado tiene una activación rápida a los 15 min, una transcripción transitoria con un aumento máximo en la expresión de mRNA a los 30 min y un aumento en la expresión de proteína a los 120 min. El aumento tardío en la expresión de la proteína puede deberse a la regulación de c-Fos por la cinasa ERK, la cual fosforila la Ser374 en el extremo carboxilo de c-Fos reduciendo así su velocidad de degradación (Murphy *et al.*, 2003).

La hirudina y PPACK pertenecen al grupo de los inhibidores directos de la trombina, los cuales actúan bloqueando la actividad catalítica de la trombina sin necesidad de un

intermediario como la protrombina, ambos inhibidores se unen a sitios específicos de la trombina; la hirudina forma un complejo mediante la unión de su extremo carboxilo terminal con el sitio de unión de la trombina con el fibrinógeno, llamado exosito 1 (Kaplan KL *et al.*, 2002). PPACK se une al sitio activo de la trombina y la inactiva a través de una alquilación irreversible del sitio activo His57 (Jagabandhu *et al.*, 1995). Los resultados demuestran que tanto la hirudina como el PPACK inhiben la expresión de mRNA y proteína de c-Fos, inducidas por la trombina, con lo que se comprueba la especificidad de la trombina en este proceso.

En un estudio previo en células de EPR en cultivo primario, el uso del inhibidor Y-27632 a concentración 5 μ M suprimió la fosforilación de la MLC inducida por la trombina, lo que demostró que la activación de ROCK está involucrada en este proceso (Ruiz-Loredo *et al.*, 2011). En otros estudios se ha visto que a concentración 10 μ M el y-27632 inhibe la activación de las MAPKs inducido por el factor de necrosis tumoral en células endoteliales (Nwariaku *et al.*, 2003). En células epiteliales intestinales se demostró que a concentración 10 μ M el y-27632 inhibe la fosforilación de p38 y de la cadena ligera de la miosina (MLC) (Chaturvedi *et al.*, 2011).

La expresión de proteína y mRNA de c-Fos inducida por la trombina a los 15 min no fue inhibida por la incubación de las células con el Y-27632 a concentración 5 μ M, sin embargo, a concentración 10 μ M el y-27632 inhibió de manera significativa la expresión de mRNA con respecto a las células estimuladas con trombina, lo que sugiere un papel de la vía Rho/ROCK en la expresión de c-Fos.

La Rho GTPasa transduce señales extracelulares en eventos intracelulares que dan como resultado la remodelación del esqueleto de actina pero también regula la expresión génica de genes como c-jun y c-fos. En el caso de c-fos su expresión está controlada por un arreglo de elementos del promotor entre los cuales se encuentra el factor de respuesta a

suelo (SRF) el cual es activado por RhoA independientemente de la actividad de las MAPKs, pero como consecuencia de la reorganización de la actina inducida por esta GTPasa. Específicamente, la vía que enlaza a RhoA con el SRF involucra la activación de la cinasa ROCK, la cual subsecuentemente fosforila a la LIM cinasa (LimK). LimK fosforila el factor despolimerizador de actina la cofilina, resultando en la estabilización de la F-actina. La consecuente reducción de la reserva de actina monomérica (G-actina) es detectada por el SRF el cual posteriormente se activa (Marinissen *et al.*, 2004).

Otra vía independiente de la reorganización de la actina a través de la cual ROCK podría inducir la transcripción de c-Fos, es a través de p38, una de las 3 principales MAPKs que fosforilan el dominio de transactivación TCF (Marinissen *et al.*, 2004, Soh *et al.*, 1999), así como al SRF y a CREB (Bébién *et al.*, 2003) elementos del promotor de c-Fos.

Se sabe que la cinasa ERK 1/2 induce la expresión tardía de mRNA y proteína de c-Fos, pero no es responsable de la expresión rápida de mRNA. Los resultados demuestran que ROCK sí está involucrado en la transcripción de c-Fos, sin embargo, la inhibición de la expresión de mRNA de c-Fos con el uso del Y-27632 no fue total, lo que sugiere que sumada a la vía Rho/ROCK existe otra vía de señalización involucrada en la expresión de c-Fos estimulada por trombina.

Conclusión

En este trabajo se demostró que la trombina induce la proliferación de células de EPR de la línea RPE-J, de manera específica y dosis dependiente, por una vía de señalamiento semejante a la involucrada en el efecto de la trombina sobre las células de EPR en cultivo primario, lo que valida el uso de esta línea celular como modelo para el estudio de la inducción de la proliferación del EPR inducida por la trombina.

La trombina también induce un aumento de la proteína y el mRNA del gen c-Fos a lo largo de 8 horas. Se demostró que el aumento de la expresión de la proteína inducido por la trombina tiene un perfil bifásico, con máximos de expresión a los 15 y a los 120 min, tal como se observó en células de EPR de cultivo primario. En el estímulo de la expresión del mRNA, sin embargo, sólo se observa un aumento significativo a los 30 min con un subsecuente regreso al nivel basal, resultado que difiere de lo observado en cultivo primario, ya que en estas condiciones se observa un estímulo bifásico en la expresión del mRNA, paralelo a la expresión bifásica de la proteína de c-Fos a lo largo de las 8 horas de estimulación.

Los resultados demuestran que la activación de Rho/ROCK estimulada por trombina no es necesaria en la vía de señalamiento que da como resultado expresión de proteína de c-Fos, sin embargo, sí juega un papel relevante en la expresión de mRNA de c-Fos, pero es probable que exista otra vía de señalización involucrada en este proceso.

Referencias

- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. 2010. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(9):545-54.
- Bébien M, Salinas S, Becamel C, Richard V, Linares L, Hipskind RA. 2003. Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene* 22(12):1836-47
- Chaturvedi LS, Marsh HM, Basson MD. 2011. Role of RhoA and its effectors ROCK and mDia1 in the modulation of deformation-induced FAK, ERK, p38, and MLC motogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 301(5):C1224-38.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351(Pt 1):95-105.
- Dong M, Yan BP, Liao JK, Lam YY, Yip GW, Yu CM. 2010. Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Discov Today* 15(15-16):622-9.
- Fukushima M, Nakamuta M, Kohjima M, Kotoh K, Enjoji M, Kobayashi N, Nawata H. 2005. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase (ROCK) inhibitor, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells. *Liver Int* 25(4):829-38.
- Greinacher A, Warkentin TE. 2008. The direct thrombin inhibitor hirudin. *Thromb Haemost.* 99(5):819-29. Review.
- Huntington JA, Baglin TP. 2003. Targeting thrombin--rational drug design from natural mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 24(11):589-95. Review.
- Jagabandhu Das, S. David Kimball. 1995. Thrombin Active Site Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 3:999-1007.
- Kaplan KL, Francis CW. 2002. Direct thrombin inhibitors. *Semin Hematol.* 39(3):187-96. Review.
- Karin M, Zheng-gang L, Ebrahim Z. 1997. AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biolog.*, Volume 9, Issue 2, Pages 240-246
- Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. 2009. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1796(2):91-8. Review.

- Keshet Y, Seger R. 2010. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661:3-38. Review.
- Kramer RM, Roberts EF, Strifler BA, Johnstone EM. 1995. Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem* 17;270
- Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. 2007. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol* 7(3):202-12. Review.
- Ma L, Dorling A. 2012. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol.* 34(1):63-72.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53(2):245-82. Review.
- Marinissen MJ, Chiariello M, Tanos T, Bernard O, Narumiya S, Gutkind JS. 2004. The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. 14(1):29-41
- Marmor MF. 1998. Structure function and disease of the retinal pigment epithelium. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds. Marmor MF, Wolfensbersberg Tj. Oxford University Press. USA. Pp 3-12.
- Milde-Langosch K. 2005. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer* 41(16):2449-61. Review.
- Nabi IR, Mathews AP, Cohen-Gould L, Gundersen D, Rodriguez-Boulan E. 1993. Immortalization of polarized rat retinal pigment epithelium. *J Cell Sci* 104 (Pt 1):37-49.
- Nwariaku FE, Rothenbach P, Liu Z, Zhu X, Turnage RH, Terada LS. 2003. Rho inhibition decreases TNF-induced endothelial MAPK activation and monolayer permeability. *J Appl Physiol* 95(5):1889-95.
- O'Donnell A, Odrowaz Z, Sharrocks AD. 2012. Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know? *Biochem Soc Trans.* 40(1):58-66. Review.
- Palma-Nicolas JP, López E, López-Colomé AM. 2008. PKC isoenzymes differentially modulate the effect of thrombin on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci Rep* 28(6):307-17.

- Parrales A, Palma-Nicolás JP, López E, López-Colomé AM. 2010. Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression. *J Cell Physiol* 222(2):302-12.
- Pastor JC. 1998. Proliferative vitreoretinopathy: an overview. *Surv Ophthalmol* 43(1):3-18.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2):153-83. Review.
- Puro DG, Mano T, Chan CC, Fukuda M, Shimada H. 1990. Thrombin stimulates the proliferation of human retinal glial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 228:169–173.
- Rao HV, Thirumangalakudi L, Desmond P, Grammas P. 2007. Cyclin D1, cdk4, and Bim are involved in thrombin-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 101:498–505.
- Ruiz-Loredo AY, López E, López-Colomé AM. 2011. Thrombin promotes actin stress fiber formation in RPE through Rho/ROCK-mediated MLC phosphorylation. *J Cell Physiol*. 226(2):414-23
- Schwartz GK, Shah MA. 2005. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 23(36):9408-21. Review.
- Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. 2010. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier-- implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol*. Review.
- Soh JW, Lee EH, Prywes R, Weinstein IB. 1999. Novel roles of specific isoforms of protein kinase C in activation of the c-fos serum response element. *Mol Cell Biol* 19(2):1313-24.
- Sonoda S, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR. 2009. A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc*. 4(5):662-73.
- Spaide RF, Yannuzzi LA. Manifestations and pathophysiology serous detachment of the retinal pigment epithelium and retina. *The Retinal Pigment Epithelium*. EDS: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA 1998. Pp. 439-455.

- Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. 2007. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* 98 (5):629-35. Review.
 - Trejo J. 2003. Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* 307(2):437-42. Review.
 - Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. 2002. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 39 (4-5):187-99. Review.
- Ver índice