

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Especificidad de unión de los anticuerpos anti-PDGF AA y anti-PDGF-BB

Se realizaron ensayos “*slot-blot*” para determinar la especificidad de unión de los anticuerpos policlonales anti-PDGF-AA y anti-PDGF-BB (Genzyme) utilizados para la inmunodetección de la unión de las isoformas de PDGF en la superficie de las células CHO y hASMC. El anticuerpo anti-PDGF-AA fue utilizado para la inmunodetección de las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-AA_S y el anticuerpo anti-PDGF-BB fue utilizado para la inmunodetección de las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S.

PDGF- Anticuerpo	AA _L	AA _S	BB _L	BB _S
anti-PDGF-AA	20.35 x 10E4	18 x 10E4	14 x 10E4	3.1 x 10E4
anti-PDGF-BB	7.6 x 10E4	5.4 x 10E4	101.5 x 10E4	83.6 x 10E4

Tabla 4.1. *Especificidad de unión de los anticuerpos anti-PDGF-AA y anti-PDGF-BB*. La tabla muestra los resultados procedentes de la cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas en los ensayos “*slot-blot*”. En los ensayos se utilizó 0.6 µg de las isoformas de PDGF y 20 µg de los anticuerpos anti-PDGF-AA o anti-PDGF-BB. El film fue escaneado y la señal de las bandas cuantificada en el programa IMAT.

Los resultados indican que el anticuerpo anti-PDGF-AA reconoce ambas isoformas PDGF-AA_L y PDGF-AA_S por igual. El anticuerpo anti-PDGF-AA también reconoce la isoforma PDGF-BB_L. Por otro lado, el anticuerpo anti-PDGF-BB sólo reconoce las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S mientras que no reconoce las isoformas PDGF-AA. Estos resultados se repitieron para otros anticuerpos comerciales (Santa Cruz) y también se observa en anticuerpos policlonales específicos de la isoforma PDGF-AA_L que también reconocen aunque con menor afinidad la isoforma PDGF-BB_L (Östergren-Lundén et al. 2003). Sin embargo, la unión del PDGF-BB_L en la superficie de las células CHO era indetectable con el anticuerpo anti-PDGF-AA.

4.2 Unión de las isoformas de PDGF a los glicosaminoglicanos de las células CHO

Para estudiar la unión de las isoformas de PDGF en la membrana de las células CHO, se realizaron experimentos de “*binding*” seguidos de un doble marcaje de las células: el de las isoformas de PDGF que permite observar el patrón de unión del PDGF en la superficie de las células y el marcaje de la concanavalina que permite delimitar la membrana extracelular. La unión de las isoformas de PDGF se comparó con la unión de la bLPL, que es una proteína que presenta un patrón característico de unión a heparán sulfatos en las células CHO K1 (WT).

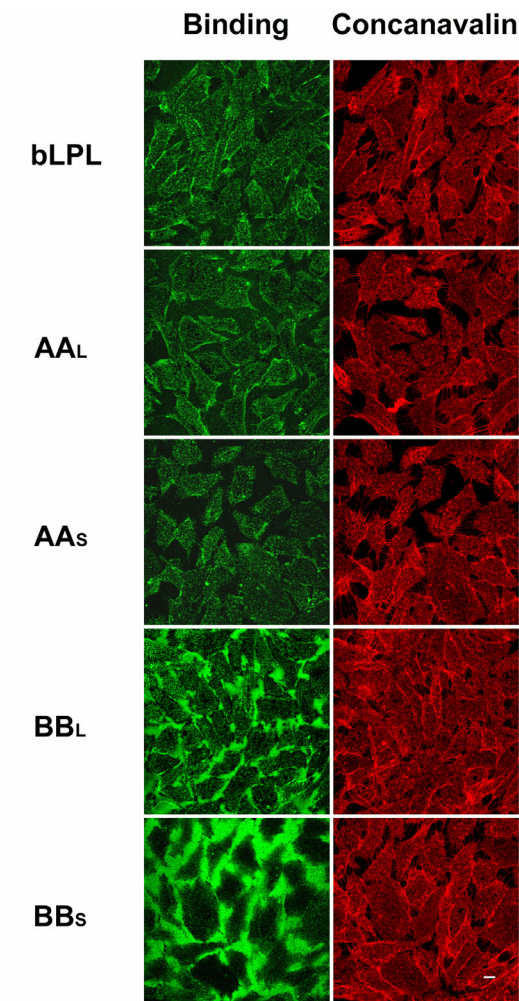


Figura 4.1. Distribución de la unión de la bLPL /isoformas del PDGF en la superficie de las células CHO K1. Las células CHO K1 (WT) se incubaron a 4°C con la bLPL (2.5 µg/ml) /isoformas de PDGF (10 µg/ml) para permitir su unión a la membrana extracelular. Mediante un protocolo de inmunocitoquímica, las células CHO K1 se marcaron para la bLPL /isoformas de PDGF con anticuerpos secundarios conjugados con FITC (columna de la izquierda) y para la concanavalina-biotina con estreptavidina-Texas Red (columna de la derecha). Se analizaron imágenes de proyecciones tridimensionales de tipo *extended-focus* obtenidas a partir de 9 secciones en microscopía confocal (Barra = 10 µm).

El marcaje de la concanavalina nos permitió delimitar el área de la superficie de cada célula para poder así cuantificar la cantidad de fluorescencia asociada a la superficie extracelular debida a la unión del PDGF en las células CHO.

4.2.1 Concentración óptima de unión de bLPL /isoformas de PDGF en la superficie celular de CHO K1

Las células CHO K1 (WT) se incubaron a 4°C con concentraciones crecientes de bLPL /isoformas de PDGF (0, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10 µg/ml) para poder establecer la concentración óptima de unión a las células. Se cuantificó la fluorescencia derivada de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF a la superficie celular.

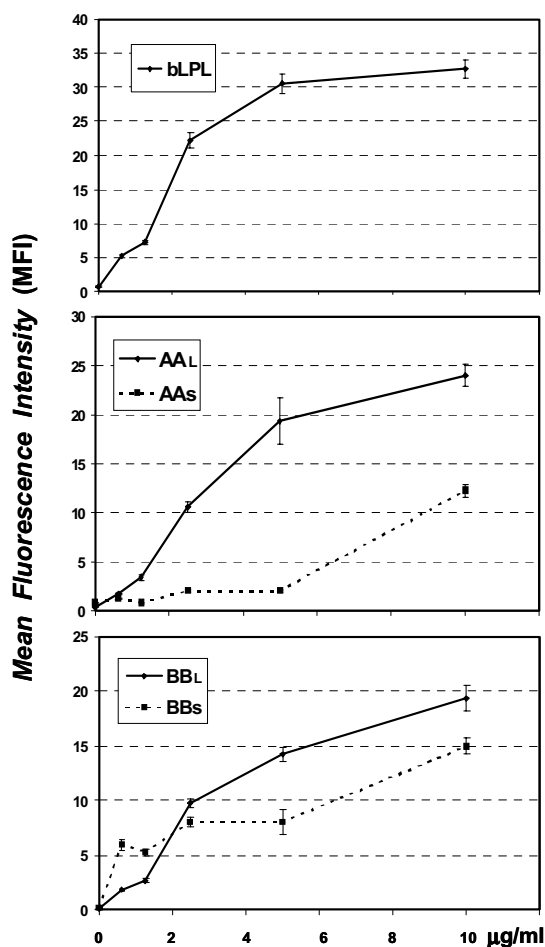


Figura 4.2. Unión de la bLPL /isoformas del PDGF en las células CHO K1. Las células CHO K1 (WT) se incubaron con concentraciones crecientes de bLPL /isoformas de PDGF (0, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$). La fluorescencia asociada a la superficie celular calculada a partir del marcaje de la concanavalina se cuantificó en el programa Metamorph y se expresó en unidades MFI (*Mean Fluorescence Intensity*). Los datos representan un promedio entre los valores MFI de $n \approx 50$ células provenientes de distintos campos. Las barras de error representan error estándar. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

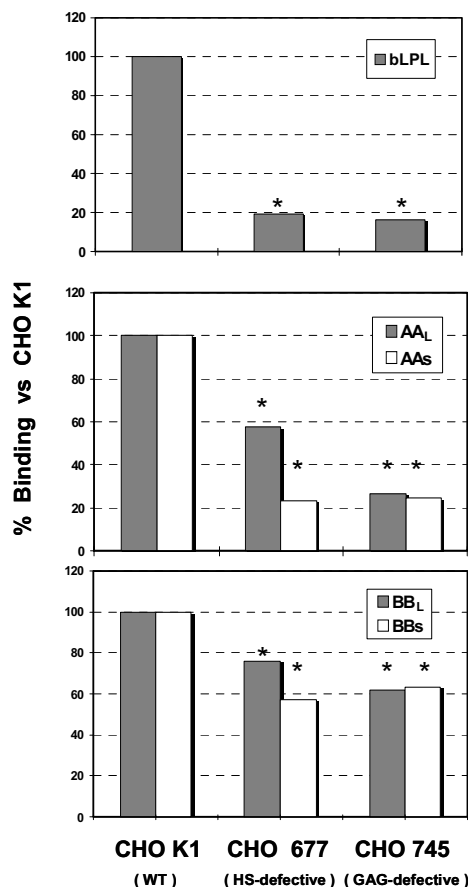
Se observa un incremento exponencial en la unión de la bLPL y de las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-BB_L a las células dependiente de la concentración. La unión de las isoformas PDGF-AA_S y PDGF-BB_S aumentan de manera significativa a partir de una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. Haciendo un cálculo de la pendiente obtenida a partir de la regresión lineal de los datos para un rango de concentraciones de 0-5 $\mu\text{g/ml}$, se observa que la pendiente es 15.8 veces mayor para el PDGF-AA_L (3.96; $r = 0.99$) que para el PDGF-AA_S (0.25; $r = 0.81$). La pendiente es 2.4 veces mayor para el PDGF-BB_L (2.97; $r = 0.97$) que para el PDGF-BB_S (1.21; $r = 0.74$). La unión de la bLPL a la superficie celular presenta un alto valor de pendiente (6.19, $r = 0.97$), lo que indica su alta afinidad de unión a las células.

Los resultados sugieren que el PDGF-AA_L tiene más afinidad de unión a las células que el PDGF-AA_S mientras que las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S presentan una afinidad similar de unión a la superficie celular.

4.2.2 Unión a Heparán sulfatos

4.2.2.1 Unión de bLPL /isoformas de PDGF en los clones CHO

Se comparó la unión de la bLPL /isoformas de PDGF en la membrana de los clones CHO que presentan diferencias en cuanto a la expresión de GAGs para estudiar en qué proporción la bLPL y las isoformas de PDGF se unen a los heparán sulfatos (Figura 4.3). El clon CHO K1 es el clon WT y presenta 40-70% de GAGs de tipo HS y 30-55% de GAGs de tipo CS. El clon 677 no presenta HS y solamente expresa CS. El clon 745 no presenta GAGs debido a una mutación en la actividad xilosil-transferasa que permite la adición de restos glucídicos a la cadena proteica del PG.



Reducción de la unión (%) de bLPL /isoformas de PDGF respecto a CHO K1 (WT)

	bLPL	PDGF-AA _L	PDGF-AA _S	PDGF-BB _L	PDGF-BB _S
CHO-677 (HS-defectivo)	81	42	76	24	43
CHO-745 (GAG-defectivo)	84	73	75	38	37

Figura 4.3. Unión de la bLPL /isoformas de PDGF en los clones CHO. Las células CHO K1, CHO 677 y CHO 745 se incubaron a 4°C con la bLPL (2.5 µg/ml) y con las isoformas de PDGF (10 µg/ml). Posteriormente, las células se marcaron doblemente para la bLPL /isoformas de PDGF y para la concanavalina. La fluorescencia derivada de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF a la superficie celular se cuantificó en unidades MFI. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto a la unión en el clon CHO K1 (100%). Los valores que se muestran son la media de tres experimentos independientes. * : diferencias significativas vs control (p < 0.05).

La tabla inferior presenta los datos de reducción de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF (en %) resultante de la diferencia entre la unión en las células CHO K1 (100%) y la unión en el clon mutante.

Las células CHO K1, CHO 677 y CHO 745 se incubaron a 4°C con la bLPL (2.5 µg/ml) y con las isoformas de PDGF (10 µg/ml) y se cuantificó la fluorescencia derivada de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF a la superficie celular. La unión en los clones CHO 677 y CHO 745 se expresó como porcentaje respecto a la unión en el clon CHO K1. También se calcularon los valores resultantes de la diferencia entre la unión de la bLPL /isoformas de PDGF en las células CHO K1 y la unión en los clones mutantes (tabla inferior de la figura 4.3). Estos datos sugieren en qué proporción la bLPL /isoformas de PDGF se unen a los heparán sulfatos.

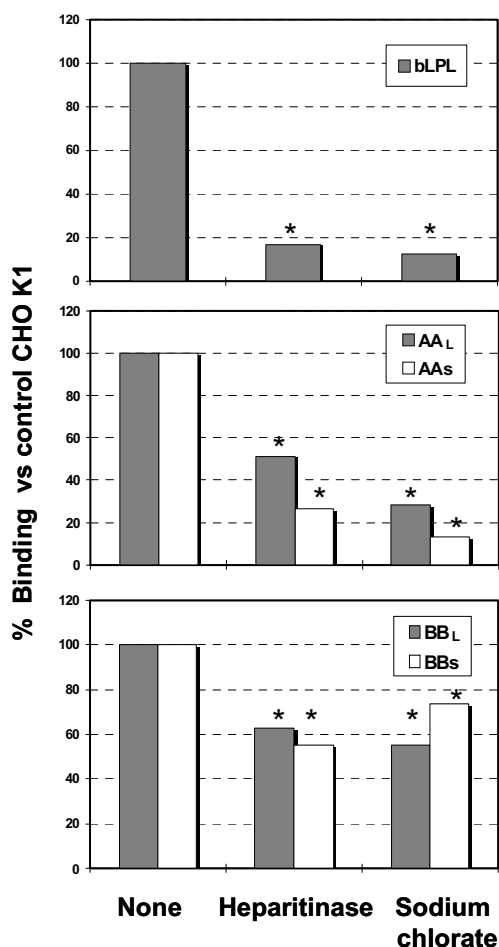
Se observa muy poca unión de la bLPL a la superficie celular de los clones CHO 677 y CHO 745 lo cual sugiere que la bLPL se une mayoritariamente a heparán sulfatos (aprox. 80%). El PDGF-AA_L se une parcialmente al clon CHO 677 y en menor grado al clon CHO 745, lo que indica una unión a heparán sulfatos del 42%. La isoforma PDGF-AA_S presenta poca unión a los clones CHO 677 y CHO 745, indicativo de su unión mayoritaria a heparán sulfatos (76%).

Respecto a las isoformas PDGF-BB, el PDGF-BB_L se une en una proporción del 76% al clon 677 y del 62% al clon 745, lo cual sugiere una unión a heparán sulfatos del 24%. El PDGF-BB_S se une en una proporción similar en ambos clones mutantes, lo cual es indicativo de una unión a heparán sulfatos de aprox. 40%.

4.2.2.2 Unión de bLPL/ isoformas de PDGF en CHO K1 tratadas con Heparitinasa I y clorato sódico

Las células CHO K1 (clon WT) se trataron con heparitinasa y clorato sódico previamente al experimento de “*binding*” para estudiar en qué proporción la bLPL/ isoformas de PDGF se unen a los heparán sulfatos (Figura 4.4). De esta manera, las células CHO K1 se incubaron durante 2h con Heparitinasa I (0.1 U/ml) para eliminar de la superficie celular a los GAGs de tipo heparán sulfato. Por otro lado, las células CHO K1 se sembraron en presencia de clorato sódico (30mM) para impedir la sulfatación de los GAGs y se procedió al experimento de “*binding*” con la bLPL/ isoformas de PDGF. Se cuantificó la fluorescencia procedente de la unión de la bLPL/ isoformas de PDGF a la superficie de las células y se comparó con la unión en las células control (sin tratamiento).

La unión en la superficie de las células tratadas se expresó como porcentaje respecto a la unión en las células control. Igualmente se calcularon los valores resultantes de la diferencia entre la unión de la bLPL/ isoformas de PDGF en las células CHO K1 control y la unión en las células tratadas con Heparitinasa I o clorato sódico (tabla inferior de la Figura 4.4). Estos datos indican en qué proporción la bLPL/ isoformas de PDGF se unen a los heparán sulfatos.



Reducción de la unión (%) de bLPL /isoformas de PDGF respecto a CHO K1 control

	bLPL	PDGF-AA _L	PDGF-AA _S	PDGF-BB _L	PDGF-BB _S
Heparitinase-I	83	49	74	37	45
Sodium chlorate	87	72	87	41	26

Figura 4.4. Unión de la bLPL/isoformas de PDGF en CHO K1 tratadas con Heparitinasa o Clorato sódico. Las células CHO K1 se trataron con Heparitinasa I (0.1 U/ml) durante 2h a 37°C o se sembraron en presencia de clorato sódico (30mM) durante 48h previamente a la incubación a 4°C con la bLPL (2.5 µg/ml) y con las isoformas de PDGF (10 µg/ml). Posteriormente, las células se marcaron doblemente para la bLPL /isoformas de PDGF y para la concanavalina. La fluorescencia derivada de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF a la superficie celular se cuantificó en unidades MFI. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto a la unión en células control no tratadas (100%). Los valores que se muestran son la media de tres experimentos independientes. * : diferencias significativas vs control (p<0.05)

La tabla inferior presenta los datos de reducción de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF (en %) resultante de la diferencia entre la unión en las células CHO K1 control (100%) y la unión en las células tratadas con Heparitinasa I o con clorato sódico.

Se observa que tanto el tratamiento con heparitinasa como el tratamiento con clorato sódico reduce la unión de la bLPL en aprox. 80%. En el caso de las isoformas PDGF-AA, el tratamiento con heparitinasa reduce parcialmente (49%) la unión del PDGF-AA_L a la superficie de las células mientras que el tratamiento con clorato sódico reduce la unión del PDGF-AA_L en una proporción del 72%. La unión del PDGF-AA_S queda mayoritariamente reducida tras el tratamiento con Heparitinasa I y con el tratamiento de clorato sódico (74 y 87% respectivamente).

Los tratamientos con Heparitinasa I y con clorato sódico reducen parcialmente la unión del PDGF-BB_L (37% y 41% respectivamente). Asimismo, la Heparitinasa I y el clorato sódico disminuyen la unión del PDGF-BB_S a las células CHO K1 en una proporción del 45% y 26% respectivamente.

En resumen, los experimentos de “*binding*” de la bLPL/ isoformas de PDGF en los clones de CHO y los tratamientos con Heparitinasa I y clorato sódico demuestran que la unión de la bLPL es aproximadamente un 80% dependiente de HS en las células CHO. El PDGF-AA_L se une a HS en una proporción del 45% y el PDGF-AA_S se une a HS en una proporción del 75%. La unión del PDGF-BB_L es 30% y la unión del PDGF-BB_S es 45% dependiente de HS. Además, las isoformas PDGF-BB también se unen a otras proteínas en las células CHO ya que se observa unión de las isoformas PDGF-BB en el clon 745 (deficiente en GAGs) y el clorato sódico inhibe parcial y no completamente la unión de las isoformas PDGF-BB en las células CHO K1. Por tanto, podemos concluir que la unión de las isoformas PDGF-BB a los GAGs representa un 50% de su unión total en las células CHO.

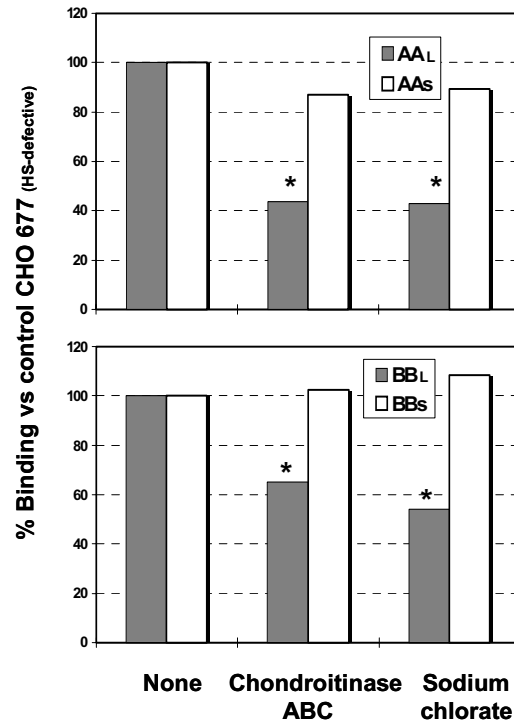
4.2.3 Unión a Condroitín sulfatos

4.2.3.1 Unión de las isoformas de PDGF en CHO 677 tratadas con Condroitinasa ABC y clorato sódico

Para estudiar la unión de las isoformas de PDGF a los condroitín sulfatos, las células CHO 677 que solamente presentan en su superficie celular GAGs de tipo condroitín sulfato fueron tratadas con Condroitinasa ABC para eliminar los residuos condroitín sulfato y con clorato sódico para suprimir la sulfatación de los condroitín sulfatos. En el primer caso, las células CHO 677 se incubaron con Condroitinasa ABC (0.01 U/ml) durante 2h a 37°C previamente al experimento de “*binding*” de las isoformas de PDGF. En el segundo caso, las células CHO 677 se sembraron en presencia de clorato sódico (30mM) durante 48h y se procedió al experimento de “*binding*” de las isoformas de PDGF. No se estudió la unión de la bLPL en las células CHO 677 debido a que la bLPL presenta muy poca unión en este clon ya que se une básicamente a GAGs de tipo heparán sulfato.

Se cuantificó la fluorescencia procedente de la unión de las isoformas de PDGF a la superficie de las células y se comparó con la unión en las células control (sin tratamiento). La unión en las células tratadas se expresó como porcentaje respecto a la unión en las células control. Igualmente se calcularon los valores resultantes de la diferencia entre la unión de las isoformas de PDGF en las células CHO 677 control y la unión en las células tratadas con Condroitinasa ABC o clorato sódico (tabla inferior de la Figura 4.5). Estos datos indican en qué proporción las isoformas de PDGF se unen a los GAGs de tipo condroitín sulfatos.

4. Resultados



Reducción de la unión (%) de las isoformas de PDGF respecto a CHO 677 control

	PDGF-AA _L	PDGF-AA _S	PDGF-BB _L	PDGF-BB _S
Chondroitinase ABC	56	13*	35	–
Sodium chlorate	57	11*	46	–

Figura 4.5. Unión de las isoformas de PDGF en células CHO 677 tratadas con Condroitinasa ABC o clorato sódico. Las células CHO 677 se trataron con Condroitinasa ABC (0.01 U/ml) durante 2h a 37°C o se sembraron en presencia de clorato sódico (30mM) durante 48h previamente a la incubación a 4°C con las isoformas de PDGF (10 µg/ml). Posteriormente, las células se marcaron doblemente para las isoformas de PDGF y para la concanavalina. La fluorescencia derivada de la unión de las isoformas de PDGF a la superficie celular se cuantificó en unidades MFI. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto a la unión en células control no tratadas (100%). Los valores que se muestran son la media de tres experimentos independientes. * : diferencias significativas vs control ($p < 0.05$)

La tabla inferior presenta los datos de reducción de la unión de las isoformas de PDGF (en %) resultante de la diferencia entre la unión en las células CHO 677 control (100%) y la unión en las células tratadas con Condroitinasa ABC o con clorato sódico.

* : no hay diferencias significativas vs control ($p < 0.05$)

– : no hay inhibición

Los resultados indican que las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-BB_L son las isoformas más afectadas por el tratamiento con la condroitinasa y con el clorato sódico. Se observa que la unión del PDGF-AA_L en las células CHO 677 se reduce en un 56% con el tratamiento de Condroitinasa ABC y en un 57% con el tratamiento de clorato sódico. La unión del PDGF-BB_L se reduce en un 35% con el tratamiento de Condroitinasa ABC y en un 46% con el tratamiento de clorato sódico. La unión de las isoformas PDGF-AA_S y PDGF-BB_S en el clon CHO 677 que es similar a la unión de las mismas isoformas en el clon CHO 745 (Figura 3.3) no se reduce significativamente tras los tratamientos. También se realizó la digestión con Condroitinasa ABC en las células CHO K1 (WT) y se estudió la unión de las isoformas de PDGF en éstas células. Se observó que el tratamiento con Condroitinasa ABC disminuye la unión de las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-BB_L en un 45% y 20% respectivamente, mientras que la unión de las isoformas de cadena corta no variaba en las células CHO K1. Estos resultados nos permiten concluir que la unión del PDGF-AA_L es 50% dependiente de CS y que la unión del PDGF-BB_L es 30% dependiente de CS.

4.2.4 Unión de la bLPL/ isoformas de PDGF en presencia de heparina de bajo peso molecular (LMWH), heparán-sulfato (HS), condroitín sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS)

Las células CHO K1 (WT) se incubaron con la bLPL /isoformas de PDGF en presencia de concentraciones crecientes (10 ng/ml – 1 mg/ml) de los siguientes GAGs: heparina de bajo peso molecular (LMWH), heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS). Se cuantificó la fluorescencia procedente de la unión de la bLPL/isoformas de PDGF en presencia del LMWH, HS, CS o DS en la superficie de las células y se comparó con la unión en las células control (en ausencia de GAG). Se calcularon los valores resultantes de la diferencia entre la unión de la bLPL /isoformas de PDGF en las células CHO K1 control y la unión en presencia de los GAGs y se expresaron como % de inhibición o reducción de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF (Tabla 4.2).

La unión de la bLPL en las células CHO K1 se reduce progresivamente en presencia de concentraciones crecientes de LMWH y a altas concentraciones (10 µg/ml-1 mg/ml) de DS y HS. El CS no inhibe la unión de la bLPL. La unión del PDGF-AA_L en las CHO K1 se reduce progresivamente en presencia de concentraciones crecientes de LMWH y a altas concentraciones (1 µg/ml-1 mg/ml) de DS. El HS y CS inhiben parcialmente la unión del PDGF-AA_L a una concentración de 1 µg/ml (45% y 60% de reducción respectivamente) pero a una concentración superior de 1 mg/ml no inhiben la unión del PDGF-AA_L. A diferencia del PDGF-AA_L, la unión del PDGF-AA_S en las CHO K1 sólo se reduce parcialmente por DS (52%) a una concentración de 1 mg/ml.

La unión del PDGF-BB_L en las células CHO K1 se reduce progresivamente en presencia de concentraciones crecientes de LMWH y de DS. El HS y CS inhiben parcialmente la unión del PDGF-BB_L a una concentración de 1 mg/ml (37% y 51% de reducción respectivamente). La unión del PDGF-BB_S en las CHO K1 sólo se reduce parcialmente por LMWH y por DS.

4. Resultados

Reducción de la unión (%) de bLPL /isoformas de PDGF respecto a CHO K1 control

	bLPL			
[GAG]	LMWH	HS	CS	DS
100 ng/ml	40	–	–	–
10 µg/ml	76	–	–	45
1 mg/ml	82	91	–	94

	PDGF-AA _L /PDGF-AA _S							
	LMWH		HS		CS		DS	
PDGF- [GAG]	AA _L	AA _S	AA _L	AA _S	AA _L	AA _S	AA _L	AA _S
10 ng/ml	42	–	25	–	27	11	–	–
1 µg/ml	75	–	45	–	60	–	53	31
1 mg/ml	90	–	–	–	–	–	73	52

	PDGF-BB _L /PDGF-BB _S							
	LMWH		HS		CS		DS	
PDGF- [GAG]	BB _L	BB _S	BB _L	BB _S	BB _L	BB _S	BB _L	BB _S
10 ng/ml	6	–	10	–	8	5	–	47
1 µg/ml	20	31	22	–	51	–	12	29
1 mg/ml	98	31	37	–	51	–	94	–

Tabla 4.2. Reducción de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF por LMWH, HS, CS y DS. Las células CHO K1 se incubaron a 4°C con la bLPL (2.5 µg/ml) y con las isoformas de PDGF (10 µg/ml) en presencia de concentraciones crecientes de (10 ng/ml – 1 mg/ml) de GAGs: heparina de bajo peso molecular (LMWH), heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS). Posteriormente, las células se marcaron doblemente para la bLPL /isoformas de PDGF y para la concanavalina. La fluorescencia derivada de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF en la superficie celular se cuantificó en unidades MFI. Los resultados se expresaron como % de reducción de la unión de la bLPL /isoformas de PDGF en comparación a la unión en las células control (en ausencia de GAGs).

– : no hay inhibición

En resumen, la inhibición de la unión de las isoformas largas de PDGF: PDGF-AA_L y PDGF-BB_L en las células CHO K1 por parte de los GAGs es muy similar. Se observa que el LMWH y el DS son los GAGs que más inhiben la unión de las isoformas largas de PDGF y que esta inhibición es dosis dependiente, tal como se observa con la bLPL. En cambio, el HS y el CS inhiben parcialmente la unión del PDGF-AA_L y PDGF-BB_L. La unión de las isoformas cortas de PDGF: PDGF-AA_S y PDGF-BB_S, es parcialmente inhibida por LMWH y DS. Se puede concluir que la unión en las células CHO K1 de las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-BB_L son las más afectadas por la presencia de GAGs que la unión de las isoformas PDGF-AA_S y PDGF-BB_S.

4.3 Unión de las isoformas de PDGF en las hASMC

Se realizó un experimento de "binding" o unión de las isoformas de PDGF (Figura 4.6) a distintas concentraciones (0, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10 µg/ml) en la superficie de las hASMC quiescentes del mismo modo que el realizado en las células CHO K1 (ver apartado 4.2.1) para detectar la concentración óptima de unión de las isoformas de PDGF en las células. Seguidamente, se procedió a la cuantificación de la unión de las isoformas de PDGF en la superficie de las hASMC (Figura 4.7) como se explica en Materiales y Métodos (ver apartado 3.2.5).

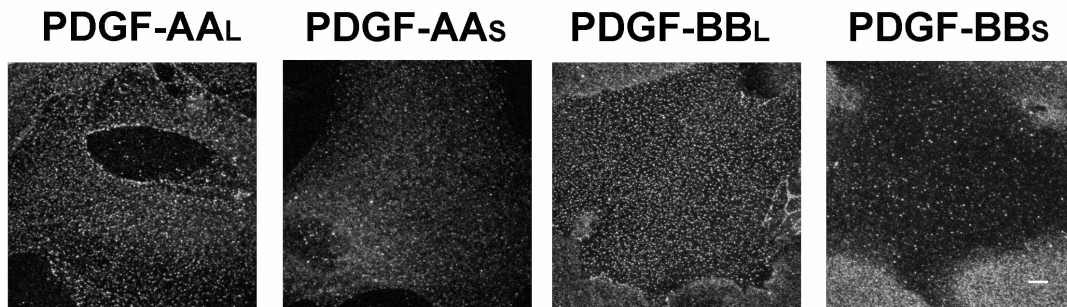


Figura 4.6. Unión de las isoformas de PDGF en la superficie de las hASMC. Las hASMC con 2 días de extensión celular se incubaron a 4°C con las isoformas de PDGF (10 µg/ml) para permitir su unión a la membrana extracelular. Las isoformas de PDGF se detectaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488. La unión del PDGF a la superficie de las células se cuantificó en imágenes de proyecciones tridimensionales de tipo *extended-focus* obtenidas a partir de 9 secciones en microscopía confocal (Barra= 5 µm).

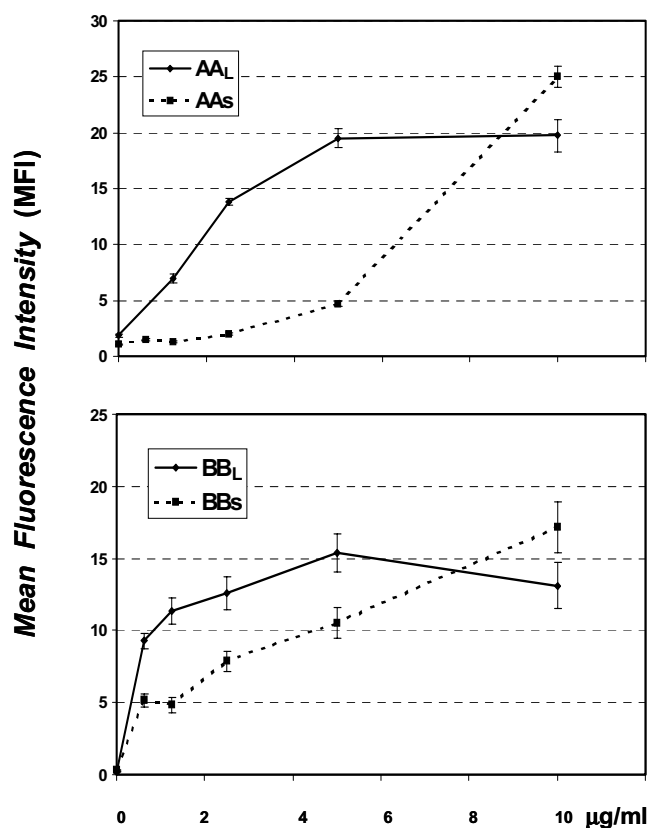


Figura 4.7. Unión de las isoformas del PDGF en las hASMC quiescentes. Las hASMC en estadio de quiescencia se incubaron con concentraciones crecientes de las isoformas de PDGF (0, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$). La fluorescencia asociada a la superficie celular calculada a partir del marcaje de la concanavalina se cuantificó en el programa Metamorph y se expresó en unidades MFI (*Mean Fluorescence Intensity*). Los datos representan un promedio entre los valores MFI de $n \geq 30$ células provenientes de distintos campos. Las barras de error representan error estándar. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes.

Se observa que hay un incremento exponencial de la unión de las isoformas de PDGF largas en la superficie de las hASMC que es dependiente de concentración de ligando, alcanzándose la saturación a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. Por otro lado, la unión de las isoformas cortas en las hASMC no se satura y a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, las isoformas cortas se unen más a las células que las isoformas largas. Haciendo un cálculo de la pendiente obtenida a partir de la regresión lineal de los datos para un rango de concentraciones de 0-5 $\mu\text{g/ml}$, se observa que la pendiente es 4.7 veces mayor para el PDGF-AA_L (3.55; $r = 0.98$) que para el PDGF-AA_S (0.75; $r = 0.96$). La pendiente es 1.3 veces mayor para el PDGF-BB_L (2.36; $r = 0.81$) que para el PDGF-BB_S (1.77; $r = 0.92$).

Estos datos indican que el PDGF-AA_L tiene más afinidad de unión a las células que el PDGF-AA_S mientras que las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S presentan una afinidad similar. Estos resultados presentan similitud con los obtenidos en las células CHO K1 (apartado 4.2.1).

4.4 Colocalización de las isoformas de PDGF con el heparán sulfato y el condroitín sulfato

Para estudiar la interacción de las isoformas de PDGF con los glicosaminoglicanos de las hASMC, realizamos estudios de colocalización entre las isoformas de PDGF y los heparán sulfatos o los condroitín sulfatos. Primeramente, analizamos el patrón de marcaje de los anticuerpos monoclonales anti-heparán sulfato y condroitín sulfato en los diferentes estadios o fenotipos de las hASMC (Figura 4.8) y a continuación, observar si la inmunodetección de estos anticuerpos era inhibida por la Heparitinasa I y la Condroitinasa ABC (Figura 4.9).

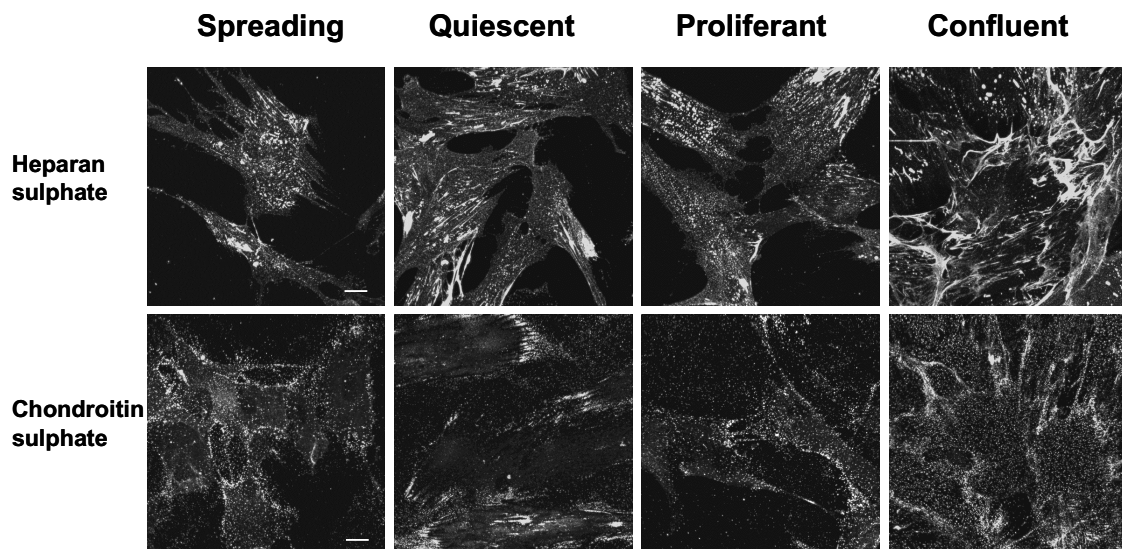


Figura 4.8. *Distribución del marcaje del heparán sulfato y del condroitín sulfato en los diferentes fenotipos de las hASMC.* Las hASMC de los diferentes fenotipos (apartado 3.3.1) se fijan y se procede al protocolo de inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-heparán sulfato o el anti-condroitín sulfato. Las imágenes que se presentan son proyecciones tridimensionales de tipo máximo obtenidas a partir de 6 secciones del microscopio confocal Olympus (Barra = 20 μm).

En la Figura 4.8 se observa que el patrón de marcaje del heparán sulfato es similar en los diferentes fenotipos de las hASMC. Se trata de un marcaje punteado en la membrana de las células y también se distingue un fuerte marcaje en forma de fibras de matriz extracelular sobre todo en las células del estadio confluyente. En cambio, el patrón de marcaje del condroitín sulfato es un punteado que se encuentra tanto fuera como dentro de las células y que se concentra en los extremos de extensión de las células, especialmente en las células del estadio quiescente.

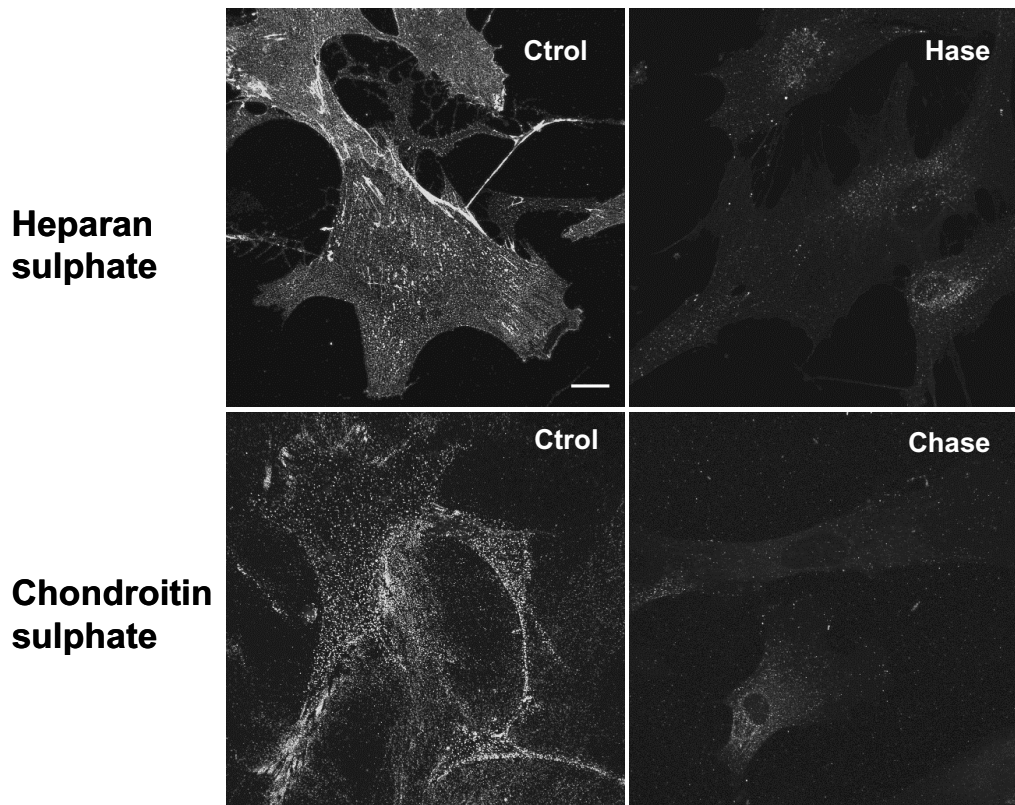


Figura 4.9. *Especificidad de los anticuerpos anti-heparán sulfato y anti-condroitín sulfato.* Las hASMC fueron tratadas con Heparitinasa-I (0.1 U/ml) o con Condroitinasa ABC (0.01 U/ml) 2h antes de ser fijadas. A continuación, se procedió con el protocolo de inmunocitoquímica para la detección del heparán sulfato y del condroitín sulfato en las células no tratadas (Ctrl) y las tratadas con las glicosidasas (Hase / Chase). Las imágenes que se presentan son proyecciones tridimensionales de tipo máximo obtenidas a partir de 6 secciones del microscopio confocal Olympus (Barra= 20 μ m).

En la Figura 4.9 se observa que el marcaje de los anticuerpos anti-heparán sulfato y condroitín sulfato es inhibido en su totalidad por la Heparitinasa I y por la Condroitinasa ABC. La Heparitinasa I elimina específicamente los residuos de tipo heparán sulfato y la Condroitinasa ABC elimina los residuos condroitín sulfatos y los dermatán sulfatos.

Seguidamente, analizamos la colocalización entre las isoformas de PDGF y los heparán sulfatos o los condroitín sulfatos. Para ello, realizamos experimentos de “*binding*” de las isoformas de PDGF en las hASMC sembradas en cubre-objetos con una extensión celular de 2 días. A continuación, se realizó una doble inmunodetección de las isoformas de PDGF y del heparán sulfato o del condroitín sulfato. En las figuras que siguen a continuación se muestran dos ejemplos de colocalización entre el PDGF-AA_L y los heparán sulfatos (Figura 4.10) y entre el PDGF-BB_L y los condroitín sulfatos (Figura 4.11).

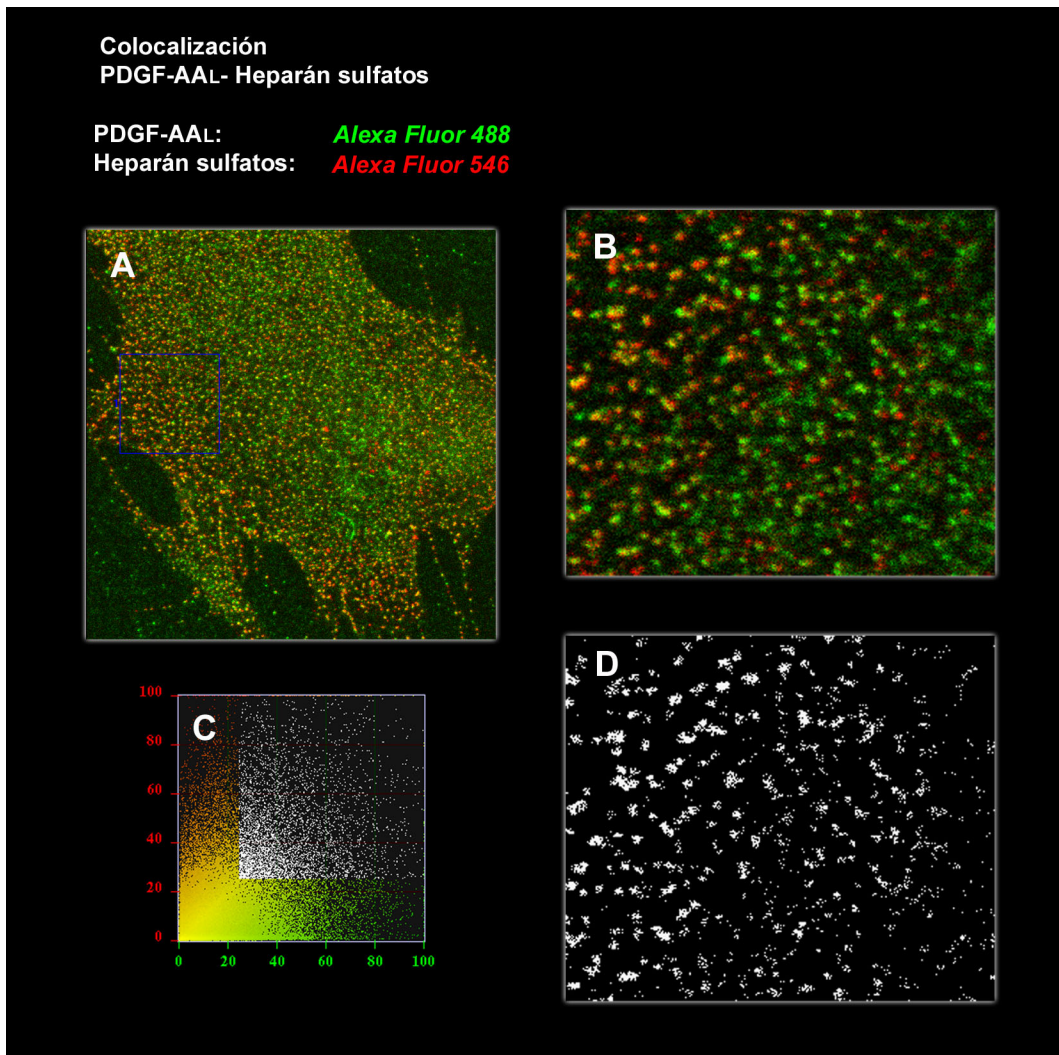


Figura 4.10. Análisis de la colocalización del PDGF-AA_L y los heparán sulfatos. Se realiza un experimento de “binding” de PDGF-AA_L (10 µg/ml) a 4°C en las hASMC con 2 días de extensión celular. A continuación, se procedió al marcaje doble del PDGF-AA_L que se detecta con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (verde) y los heparán sulfatos que se detectan con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 546 (rojo). Se realizó un estudio de la colocalización del PDGF-AA_L- heparán sulfatos en distintas regiones celulares y sección a sección (Metamorph).

A. Célula en la que se muestra la región indicada en B para el estudio de colocalización entre el PDGF-AA_L y los heparán sulfatos (proyección tridimensional de tipo máximo obtenida a partir de secciones ópticas obtenidas en el microscopio confocal Leica TCS SP2). B. Región celular correspondiente a una única sección. C. Citofluorograma donde se representan las intensidades de fluorescencia del PDGF-AA_L (verde) y los heparán sulfatos (rojo) y se muestran los puntos de colocalización en blanco de la región indicada en B (Bitplane, SGI). D. Máscara binaria que se obtiene a partir del análisis de la colocalización en el citofluorograma (Bitplane, SGI).

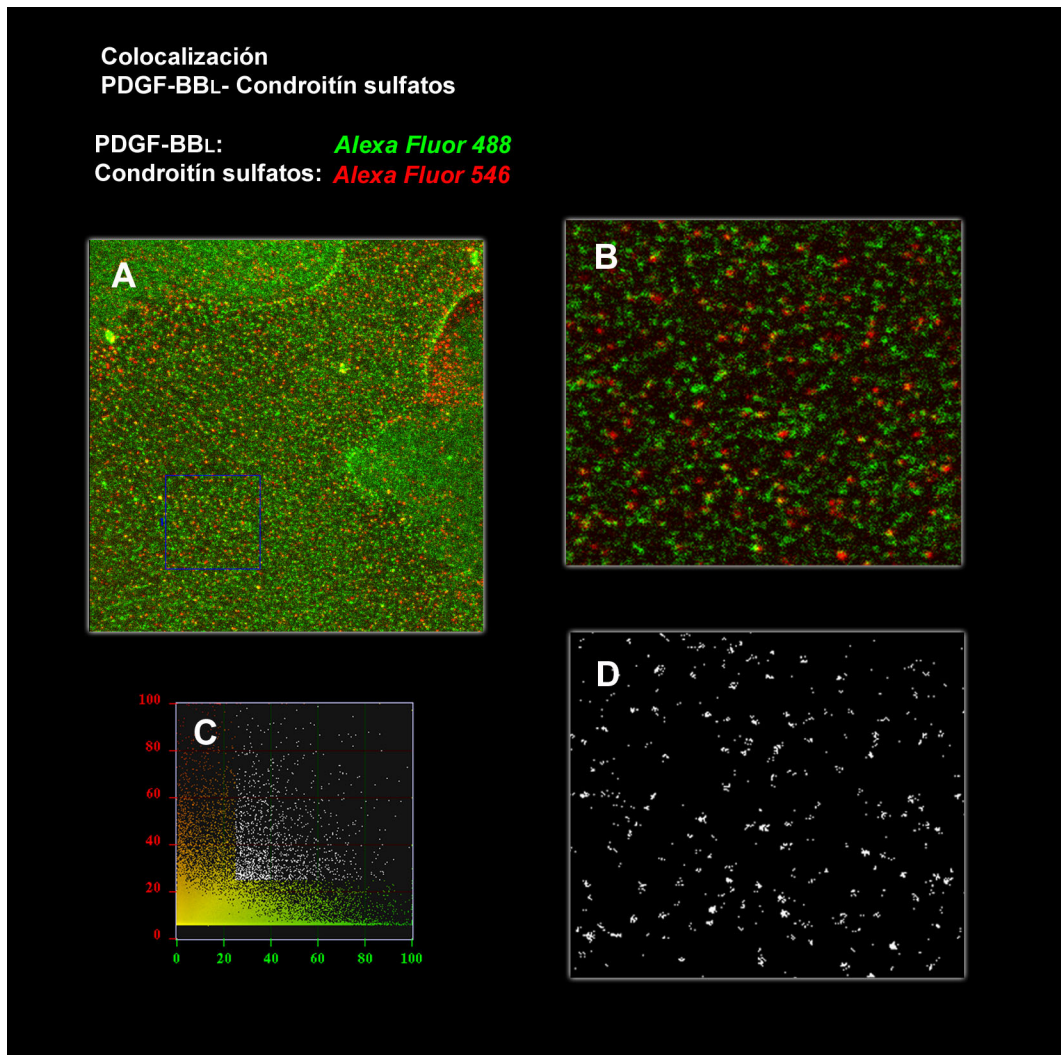


Figura 4.11. Análisis de la colocalización del PDGF-BB_L y los condroitín sulfatos. Se realiza un experimento de “binding” de PDGF-BB_L (10 µg/ml) a 4°C en las hASMC con 2 días de extensión celular. A continuación, se procedió al marcaje doble del PDGF-BB_L que se detecta con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (verde) y los condroitín sulfatos que se detectan con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 546 (rojo). Se realizó un estudio de la colocalización del PDGF-BB_L- condroitín sulfatos en distintas regiones celulares y sección a sección (Metamorph).

A. Célula en la que se muestra la región indicada en B para el estudio de colocalización entre el PDGF-BB_L y los condroitín sulfatos (proyección tridimensional de tipo máximo obtenida a partir de secciones ópticas obtenidas en el microscopio confocal Leica TCS SP2). B. Región celular correspondiente a una única sección. C. Citofluorograma donde se representan las intensidades de fluorescencia del PDGF-BB_L (verde) y los condroitín sulfatos (rojo) y se muestran los puntos de colocalización en blanco de la región indicada en B (Bitplane, SGI). D. Máscara binaria que se obtiene a partir del análisis de la colocalización en el citofluorograma (Bitplane, SGI).

También se realizó un marcaje directo de los anticuerpos anti-heparán sulfato con el fluorocromo Alexa Fluor 546 y de los anticuerpos anti-condroitín sulfato con el fluorocromo Alexa Fluor 647 con el fin de efectuar una triple inmunodetección de las isoformas de PDGF, los heparán sulfatos y los condroitín sulfatos (Figura 4.12) para estudiar la colocalización entre los heparán sulfatos y los condroitín sulfatos (Figura 4.13).

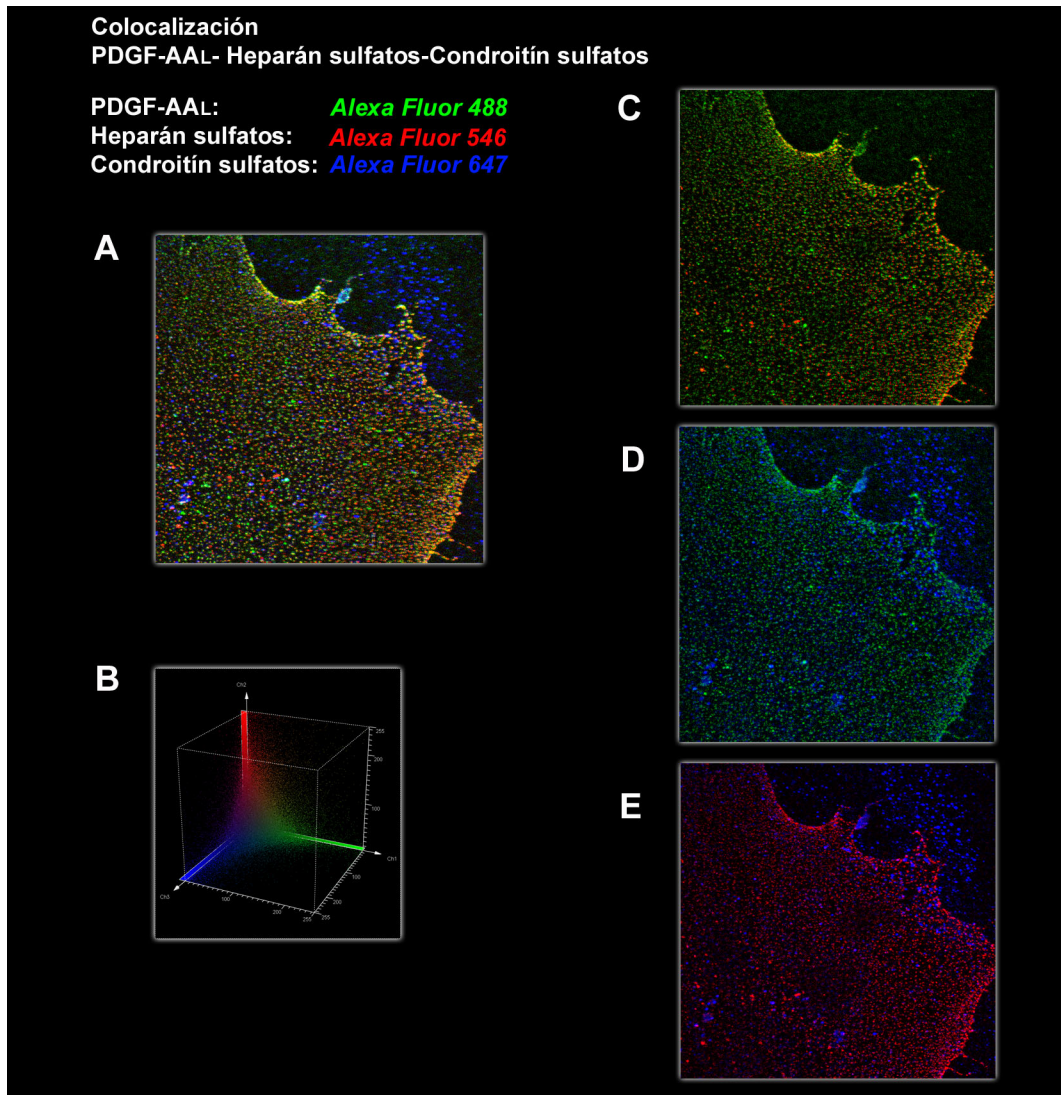


Figura 4.12. Triple inmunodetección del PDGF-AA_L, heparán sulfatos y condroitín sulfatos. Los anticuerpos primarios anti-heparán sulfatos y anti-condroitín sulfatos se marcaron directamente con los fluorocromos Alexa Fluor 546 (rojo) y Alexa Fluor 647 (azul) respectivamente. La unión del PDGF-AA_L se detectó con anticuerpos primarios anti-PDGF-AA y a continuación con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (verde). El análisis de la colocalización se realizó siempre entre dos marcajes: PDGF-AA_L y heparán sulfatos; PDGF-AA_L y condroitín sulfatos; y entre heparán sulfatos y condroitín sulfatos.

A: Proyección tridimensional de tipo máximo obtenida a partir de secciones ópticas obtenidas en el microscopio confocal Leica TCS SP2. B: Citofluorograma en el cual se representan la intensidad de fluorescencia de los tres marcajes correspondiente a una única sección que se muestra en C, D y E (Leica TCS SP2). C: Doble marcaje del PDGF-AA_L y heparán sulfatos. D: Doble marcaje del PDGF-AA_L y condroitín sulfatos. E: Doble marcaje de los heparán sulfatos y condroitín sulfatos.

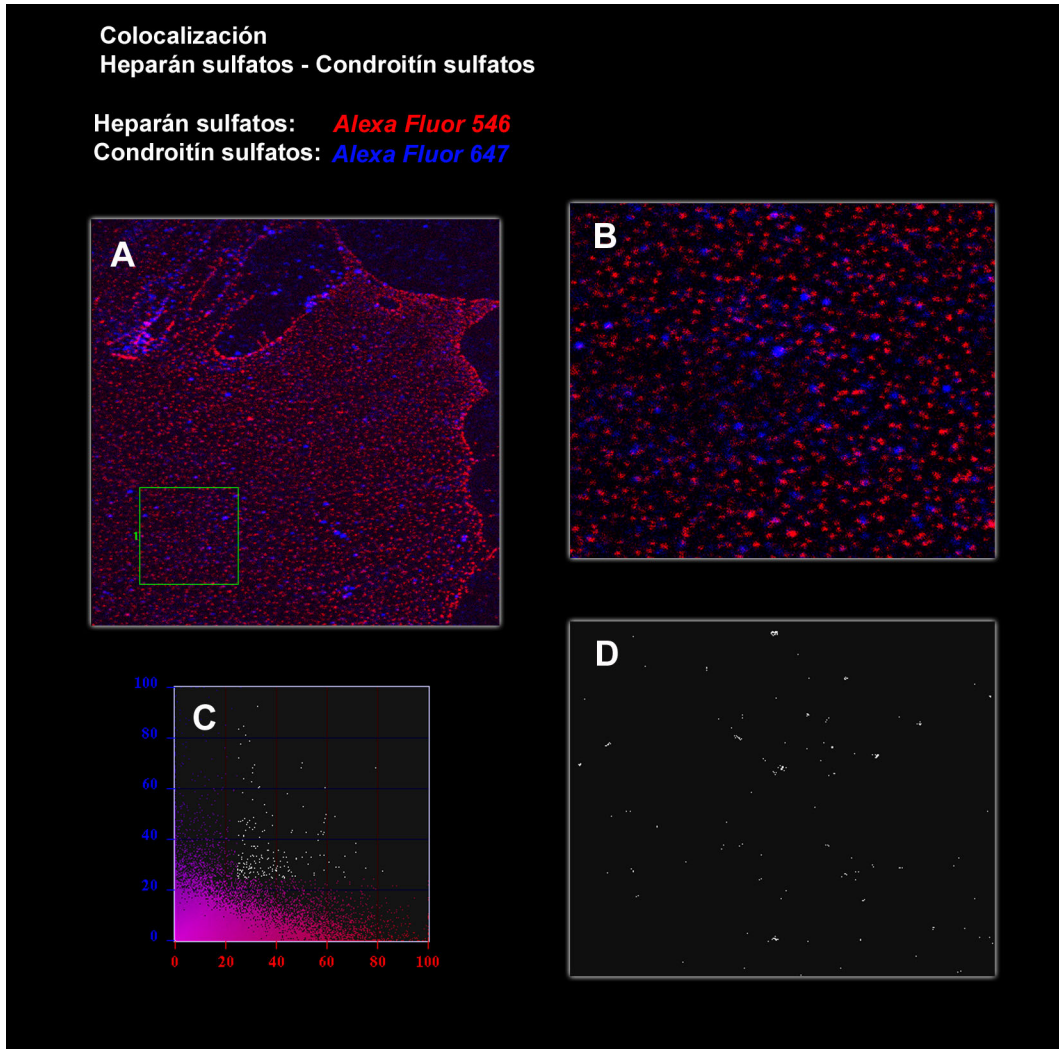


Figura 4.13. *Análisis de la colocalización de los heparán sulfatos y condroitín sulfatos.* Se realiza un experimento de “binding” de alguna de las isoformas de PDGF (10 $\mu\text{g/ml}$) a 4°C en las hASMC con 2 días de extensión celular. A continuación, se procedió al marcaje triple de la isoforma de PDGF que se detecta con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (verde); los heparán sulfatos que se detectan con el anticuerpo primario conjugado con Alexa Fluor 546 (rojo) y los condroitín sulfatos que se detectan con el anticuerpo primario conjugado con Alexa Fluor 647 (azul). En esta figura, sólo se muestra la colocalización entre los heparán sulfatos y los condroitín sulfatos. Se realizó un estudio de la colocalización de los heparán sulfatos y condroitín sulfatos en distintas regiones celulares y sección a sección (Metamorph).

A. Célula en la que se muestra la región indicada en B para el estudio de colocalización entre los heparán sulfatos y condroitín sulfatos (proyección tridimensional de tipo máximo obtenida a partir de las secciones ópticas obtenidas en el microscopio confocal Leica TCS SP2). B. Región celular correspondiente a una única sección. C. Citofluorograma donde se representan las intensidades de fluorescencia de los heparán sulfatos (rojo) y los condroitín sulfatos (azul) y se muestran los puntos de colocalización en blanco de la región indicada en B (Bitplane, SGI). D. Máscara binaria que se obtiene a partir del análisis de la colocalización en el citofluorograma (Bitplane, SGI).

4. Resultados

Los resultados de la colocalización se analizan tal como se explica en los Materiales y Métodos utilizando los coeficientes de correlación de Pearson comparando entre dos marcajes: las isoformas de PDGF y los heparán sulfatos; las isoformas de PDGF y los condroitín sulfatos y finalmente los heparán sulfatos respecto a los condroitín sulfatos. **Los coeficientes de correlación de Pearson presentan valores entre el 0 (colocalización nula) y el 1 (colocalización máxima) y dan una idea del grado de colocalización entre dos marcajes.**

C	PDGF-AA _L	PDGF-AA _S	PDGF-BB _L	PDGF-BB _S
Heparán sulfatos	0.47	0.3	0.5	0.25
	0.42	0.15	0.35	0.06
Condroitín sulfatos	0.35	0.17	0.24	0.13
	0.18	0.12	0.24	0.05

Tabla 4.3. Coeficientes de correlación de Pearson (C) de la colocalización entre las isoformas de PDGF y los heparán /condroitín sulfatos. Las hASMC se siembran en cubre-objetos y al 2° día de extensión celular, se realiza un experimento de “binding” de las isoformas de PDGF. Seguidamente, se procede a la doble o triple inmunodetección de las isoformas de PDGF, los heparán y/o los condroitín sulfatos. Se consideró el máximo valor de colocalización entre la isoforma de PDGF respecto al heparán/condroitín sulfato por región celular analizada y se analizaron de 15-20 diferentes regiones celulares. Los valores que se muestran en el extremo superior derecho de los recuadros, representan el valor de máxima colocalización entre las isoformas de PDGF respecto a los heparán/ condroitín sulfatos y los valores que se encuentran en el extremo inferior izquierdo representan el valor de máxima colocalización entre los heparán/ condroitín sulfatos respecto a las isoformas de PDGF.

Binding	PDGF-AA _L	PDGF-AA _S	PDGF-BB _L	PDGF-BB _S
C	Heparán sulfatos			
Condroitín sulfatos	0.15	0.18	0.13	0.05
	0.1	0.1	0.14	0.15

Tabla 4.4. Coeficientes de correlación de Pearson (C) de la colocalización entre los heparán sulfatos y los condroitín sulfatos. Las hASMC se siembran en cubre-objetos y al 2° día de extensión celular, se realiza un experimento de “binding” de las isoformas de PDGF. Seguidamente, se procede a la triple inmunodetección de las isoformas de PDGF, los heparán y/o los condroitín sulfatos. En este caso, se representa el máximo valor de colocalización entre los heparán sulfato y los condroitín sulfato de 15-20 regiones celulares que presentaban la unión de las isoformas de PDGF que se indican en la parte superior de la tabla. Los valores que se muestran en el extremo superior derecho de los recuadros, representan el máximo valor de colocalización entre los heparán sulfatos respecto a los condroitín sulfatos y los valores que se encuentran en el extremo inferior izquierdo representan el máximo valor de colocalización entre los condroitín sulfatos respecto a los heparán sulfatos.

Podemos concluir que las isoformas de PDGF en general presentan mayor colocalización con los heparán sulfatos que con los condroitín sulfatos. Las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-BB_L presentan mayor colocalización con los condroitín sulfatos que las isoformas de cadena corta PDGF-AA_S y PDGF-BB_S. Los heparán sulfatos colocalizan muy poco con los condroitín sulfatos y los condroitín sulfatos colocalizan muy poco con los heparán sulfatos.

4.5 Mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

4.5.1 Concentración óptima de las isoformas de PDGF que inducen mitogénesis en las hASMC

Las hASMC deprivadas de suero se incuban con concentraciones crecientes de las isoformas de PDGF: 1, 5, 10 y 50 ng/ml o de S-BM y se cuenta la radioactividad (dpm) de la ³H-timidina incorporada como medida de la mitogénesis o síntesis de DNA en las hASMC.

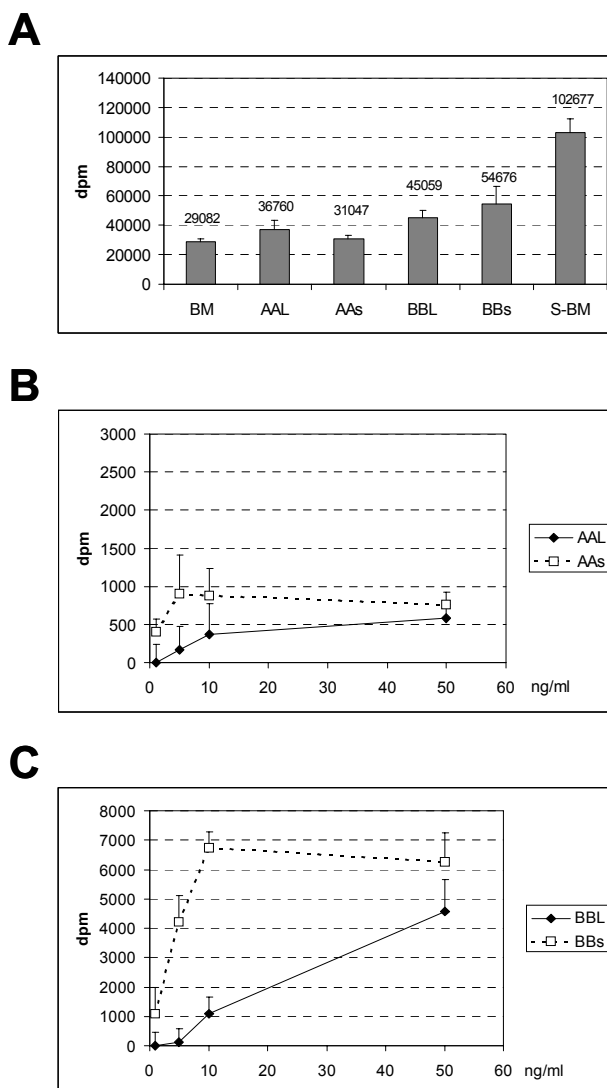


Figura 4.14. Incorporación de ³H-timidina en las hASMC inducida por las isoformas de PDGF. Las hASMC se deprivan de suero durante 3 días y se induce la síntesis de DNA durante 24h con la adición de los diferentes factores de crecimiento. La ³H-timidina incorporada se expresa en valores absolutos (dpm=desintegraciones por minuto). Se representa la media de triplicados y su correspondiente desviación estándar. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. A. Comparación de la mitogénesis en las hASMC inducida por las diferentes isoformas de PDGF (10 ng/ml) y por el S-BM (medio completo). El control negativo representa la incorporación basal de ³H-timidina, sin adición de ningún factor de crecimiento (BM= medio basal). B. Mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-AA_S (1, 5, 10 y 50 ng/ml). C. Mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S (1, 5, 10 y 50 ng/ml).

Se observa que PDGF-BB_S es la isoforma que induce mayor síntesis de DNA en las hASMC. Existe un máximo de activación de la síntesis de DNA por parte de las isoformas cortas a una concentración de 10 ng/ml, mientras que a una concentración de 50 ng/ml, la inducción de la mitogénesis de las hASMC por parte de las isoformas de cadena corta y de cadena larga presenta una tendencia a igualarse. Se observan unos valores de síntesis de DNA basales en las células en las que no se ha añadido ningún factor de crecimiento (control negativo) que se explicarían por la síntesis endógena de PDGF por parte de las hASMC.

4.5.2 Efecto de la heparina en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

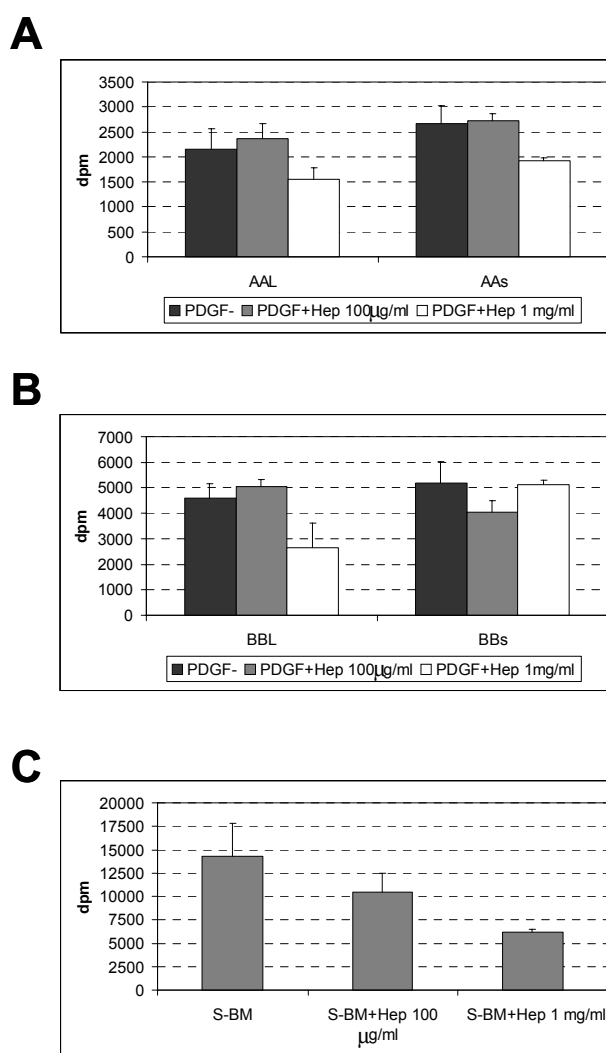
Para estudiar el papel de los glicosaminoglicanos en la proliferación inducida por el PDGF, se induce la mitogénesis de las hASMC con las isoformas de PDGF (10 ng/ml) o con S-BM y se compara con la mitogénesis de las hASMC inducida por los factores de crecimiento en presencia de heparina (100 µg/ml y 1 mg/ml) (Figura 4.15). Los valores de inhibición de la mitogénesis (%) se representan en la tabla adyacente.

Los resultados indican que una concentración de 1 mg/ml de heparina inhibe parcialmente la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas PDGF-AA_L, PDGF-AA_S y PDGF-BB_L. La heparina también inhibe la síntesis de DNA basal del control negativo a una concentración de 1 mg/ml. En el caso de la isoforma PDGF-BB_S, una concentración de 100 µg/ml de heparina inhibe la mitogénesis inducida por esta isoforma en una proporción del 22%, mientras que una concentración mayor de heparina (1 mg/ml) no tiene efecto inhibitorio. En cambio, se observa que la heparina inhibe progresivamente la síntesis de DNA inducida por el S-BM al aumentar su concentración en el medio.

4.5.3 Efecto del clorato sódico en la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

También se investigó el papel de la sulfatación de los glicosaminoglicanos en la mitogénesis de las hASMC inducida por el PDGF. Las hASMC se incuban con las isoformas de PDGF (10 ng/ml) o con S-BM en presencia de clorato sódico (10-30 mM) y se compara con la mitogénesis inducida por las isoformas de PDGF o de S-BM sin clorato sódico (Figura 4.16). Los valores de inhibición de la mitogénesis (%) se muestran en la tabla adyacente.

Observamos que a una concentración de 10 mM de clorato sódico, la mitogénesis inducida por las isoformas de PDGF se inhibe muy poco (3-19%) y la mitogénesis inducida por el suero se reduce un 30%. A una concentración de 30 mM de clorato sódico, la inhibición de la mitogénesis inducida por las isoformas de PDGF aumenta (un 50% de inhibición de la mitogénesis para las isoformas PDGF-AA y un 70% de inhibición de la mitogénesis para las isoformas PDGF-BB). En el caso de la mitogénesis activada por el suero, la síntesis de DNA disminuye un 50% para una concentración 30 mM de clorato sódico. En ausencia de PDGF (control negativo), se observa también un incremento en la proliferación que es inhibido por el clorato sódico. Se valoró la citotoxicidad del clorato sódico a 30 mM con el reactivo WST-1 y se observó que no modificaba la viabilidad de las células respecto al control (Tabla 4.5).



Reducción de la mitogénesis (%) en hASMC inducida por las isoformas de PDGF y S-BM

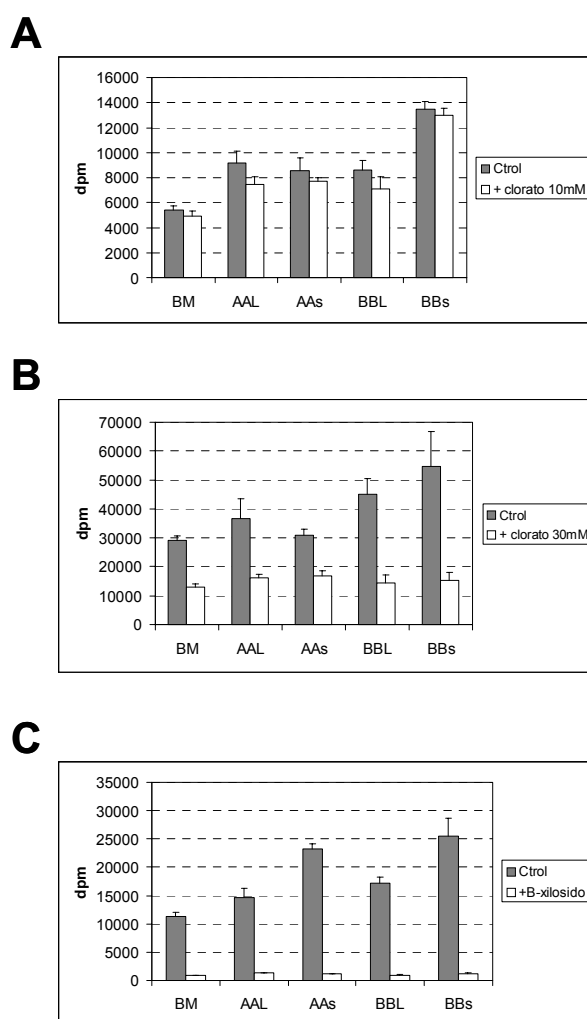
	BM	PDGF-AA _L	PDGF-AA _S	PDGF-BB _L	PDGF-BB _S	S-BM
Hep 100 µg/ml	5	–	–	–	22	27
Hep 1 mg/ml	24	28	28	43	1	57

Figura 4.15. Efecto de la heparina en hASMC en la mitogénesis inducida por las isoformas de PDGF. Las hASMC se deprivan de suero durante 3 días y se induce la síntesis de DNA durante 24 h con la adición de las isoformas de PDGF /S-BM (medio completo) en ausencia/presencia de heparina (100 µg/ml y 1 mg/ml). La ³H-timidina incorporada se expresa en valores absolutos (dpm=desintegraciones por minuto). Se representa la media de triplicados y su correspondiente desviación estándar. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes.

A. Efecto de la heparina (100 µg/ml y 1 mg/ml) en hASMC estimuladas por las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-AA_S (10 ng/ml). B. Efecto de la heparina (100 µg/ml y 1 mg/ml) en hASMC estimuladas por las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S (10 ng/ml). C. Efecto de la heparina (100 µg/ml y 1 mg/ml) en hASMC estimuladas por S-BM (medio completo).

La tabla inferior presenta los datos de inhibición (%) de la heparina en la síntesis de DNA inducida por el S-BM y las isoformas de PDGF. – : no hay inhibición.

4. Resultados



Reducción de la mitogénesis (%) en hASMC inducida por las isoformas de PDGF y S-BM

	BM	PDGF-AA _L	PDGF-AA _S	PDGF-BB _L	PDGF-BB _S	S-BM
Clorato sódico 10 mM	8	19	10	17	3	31
Clorato sódico 30 mM	53	56	46	68	72	53
β-xilósido 2 mM	92	91	95	95	95	95

Figura 4.16. Efecto del clorato sódico y del β-xilósido en la mitogénesis inducida por las isoformas de PDGF. Las hASMC se deprivan de suero durante 3 días y se induce la síntesis de DNA durante 24h con la adición de las isoformas de PDGF /S-BM (medio completo) en ausencia / presencia de clorato sódico (10 mM y 30 mM) o de β-xilósido (2 mM). También se representan los valores basales de incorporación de ³H-timidina, en ausencia de factores de crecimiento (BM=control negativo). La ³H-timidina incorporada se expresa en valores absolutos (dpm=desintegraciones por minuto). Los resultados son la media de triplicados y su correspondiente desviación estándar. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

A. Efecto del clorato sódico (10 mM) en hASMC estimuladas por las isoformas de PDGF (10 ng/ml). B. Efecto del clorato sódico (30 mM) en hASMC estimuladas por las isoformas de PDGF (10 ng/ml). C. Efecto del β-xilósido (2 mM) en hASMC estimuladas por las isoformas de PDGF (10 ng/ml).

La tabla inferior presenta los datos de inhibición (%) del clorato sódico y del β-xilósido en la síntesis de DNA inducida por el S-BM y las isoformas de PDGF. - : no hay inhibición.

4.5.4 Efecto del β -xilósido en la proliferación de las hSMC inducida por las isoformas de PDGF

El β -xilósido tiene una función inhibitoria de la síntesis de glicosaminoglicanos. Para estudiar el efecto del β -xilósido en la proliferación de las hSMC, se incuban las células con las isoformas de PDGF (10 ng/ml) o con S-BM y se compara con la proliferación de las hSMC inducida por los factores de crecimiento en presencia de β -xilósido (2 mM) (Figura 4.16). Los valores de inhibición de la mitogénesis (%) se muestran en la tabla adyacente de la Figura 4.16.

Los resultados muestran que el β -xilósido produce una disminución drástica en la síntesis de DNA inducida por las isoformas de PDGF, del suero (S-BM) y del control negativo. Igualmente se valoró la citotoxicidad del β -xilósido a 2 mM con el reactivo WST-1 y se observó que no modificaba la viabilidad de las células respecto al control (Tabla 4.5).

	Control negativo (BM)	Control positivo (SDS.0.02%)	Clorato sódico 30 mM	β -xilósido 2 mM
Absorbancia	1.269	0.198	1.385	1.265

Tabla 4.5. *Citotoxicidad del clorato sódico y del β -xilósido en las hSMC.* Las hSMC se siembran siguiendo el mismo protocolo del ensayo de mitogénesis. En algunos de los pocillos las células se tratan con clorato sódico 30 mM en BM (medio basal) durante 48 h y en otros pocillos las células se tratan con β -xilósido 2 mM en BM durante 12h. El control positivo de citotoxicidad es el tratamiento con SDS 0.02%. A continuación, se añade el reactivo celular WST-1 que en el caso de las células viables, genera el formazan que es un compuesto que presenta absorbancia a 450 nm. En la tabla se muestran los promedios de los duplicados de la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro.

4.6 Quimiotaxis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

4.6.1 Concentración óptima de las isoformas de PDGF que inducen quimiotaxis en las hASMC

Se analizó y comparó el efecto quimiotáctico de las isoformas de PDGF sobre las hASMC. Con este fin, las hASMC privadas de suero se sembraron en insertos o *transwells* y se indujo la migración de las células a través de los poros del *transwell* añadiendo concentraciones crecientes de las isoformas de PDGF: 1, 10 y 100 ng/ml. Las células que han migrado hacia la cara basal del *transwell* son teñidas con el CMFDA (1 μ M) y contadas en el LSC (*laser scanning cytometer*). La Figura 4.17 muestra imágenes obtenidas en el microscopio confocal de las hASMC migradas al compartimiento basal del *transwell*. La Figura 4.18 muestra el resultado de la cuantificación de las células migradas en el LSC.

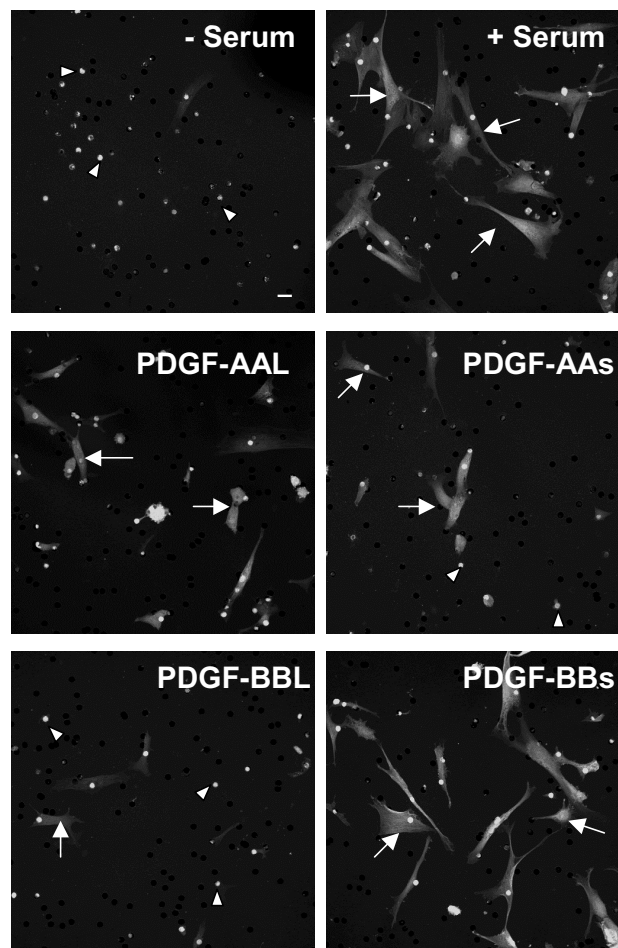


Figura 4.17. Quimiotaxis de las hASMC inducida por el suero y las isoformas de PDGF. Las hASMC quiescentes se tripsinizan y se siembran en insertos o *transwells* en BM (sin suero). Después de 2h de extensión celular, se tiñen con CMFDA y se les añade el suero (S-BM) o las isoformas de PDGF (50 ng/ml) en el compartimiento inferior del *transwell* durante 20h. Posteriormente se fijan y se observan en el microscopio. Las imágenes que se presentan son proyecciones tridimensionales de tipo máximo obtenidas a partir de 5 secciones del microscopio confocal Olympus (Barra = 20 μ m). Las flechas indican las células que han migrado y las puntas de flecha indican los poros del *transwell*.

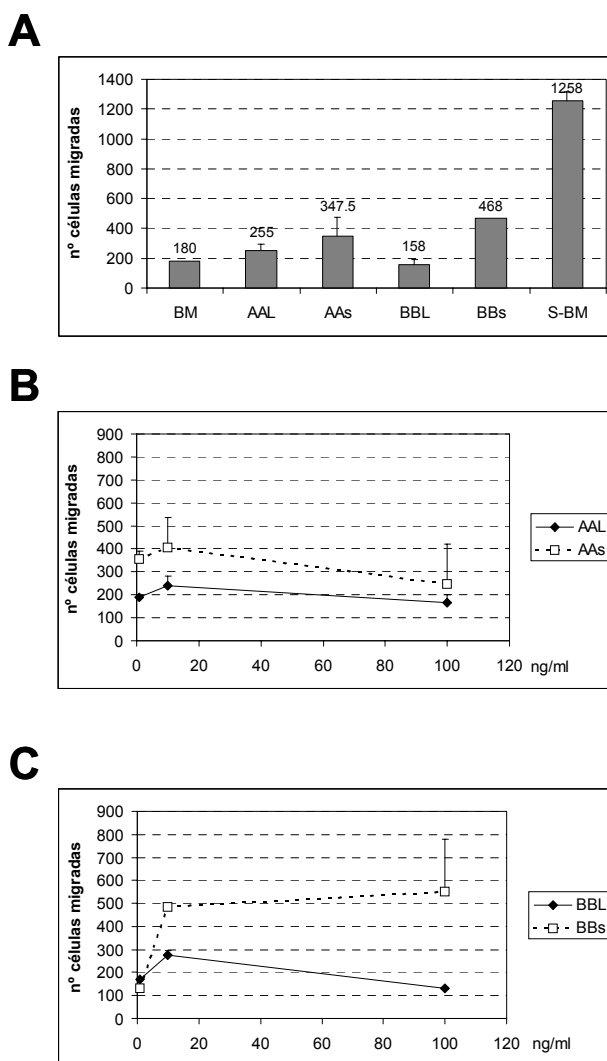


Figura 4.18. *Transmigración de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF.* Las hASMC deprivadas de suero se siembran en el compartimiento superior de los insertos o *transwells* y tras 2h de extensión celular, se tiñen con el marcador vital CMFDA (1 μ M). Se añaden las isoformas de PDGF en el compartimiento inferior del *transwell* para estimular la migración a través de los poros del *transwell* durante 20h. El número total de células migradas se cuenta en el LSC (*laser scanning cytometer*). Los resultados son la media de duplicados y se representa la desviación estándar. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes.

A. Comparación de la trans migración en las hASMC inducida por las diferentes isoformas de PDGF (50 ng/ml) y por el S-BM (medio completo). Se representa también la trans migración sin la adición de ningún factor de crecimiento (BM= medio basal). B. Trans migración de las hASMC inducida por las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-AA_S (1, 10, 100 ng/ml). C. Trans migración de las hASMC inducida por las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S (1, 10, 100 ng/ml).

Los resultados demuestran que el S-BM y la isoforma PDGF-BB_S inducen mayor trans migración en las hASMC. Cuando comparamos entre isoformas largas y cortas, se observa que las isoformas cortas: PDGF-AA_S y PDGF-BB_S inducen un mayor número de células migradas que las correspondientes isoformas de cadena larga. También se realizaron experimentos de trans migración en células sembradas en los *transwells* con revestimiento de colágeno-I (10 μ M) y se indujo la migración con las isoformas de PDGF y S-BM. No se observó ninguna diferencia significativa en la quimiotaxis respecto a las células sembradas sin revestimiento de colágeno.

4.6.2 Efecto de la heparina en la quimiotaxis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

Se examinó la función de la heparina en la trans migración de las hASMC estimulada por las isoformas de PDGF (Figura 4.19 y Figura 4.20). Se compara el número de células migradas a la cara basal del *transwell* atraídas por el efecto quimiotáctico de las isoformas de PDGF (50 ng/ml) y el número de células migradas al añadir las isoformas de PDGF (50 ng/ml) en presencia de heparina a dos concentraciones: 100 $\mu\text{g/ml}$ y 1 mg/ml. Los valores de inhibición (%) de la quimiotaxis inducida por los factores de crecimiento se indican en la tabla adyacente de la Figura 4.20.

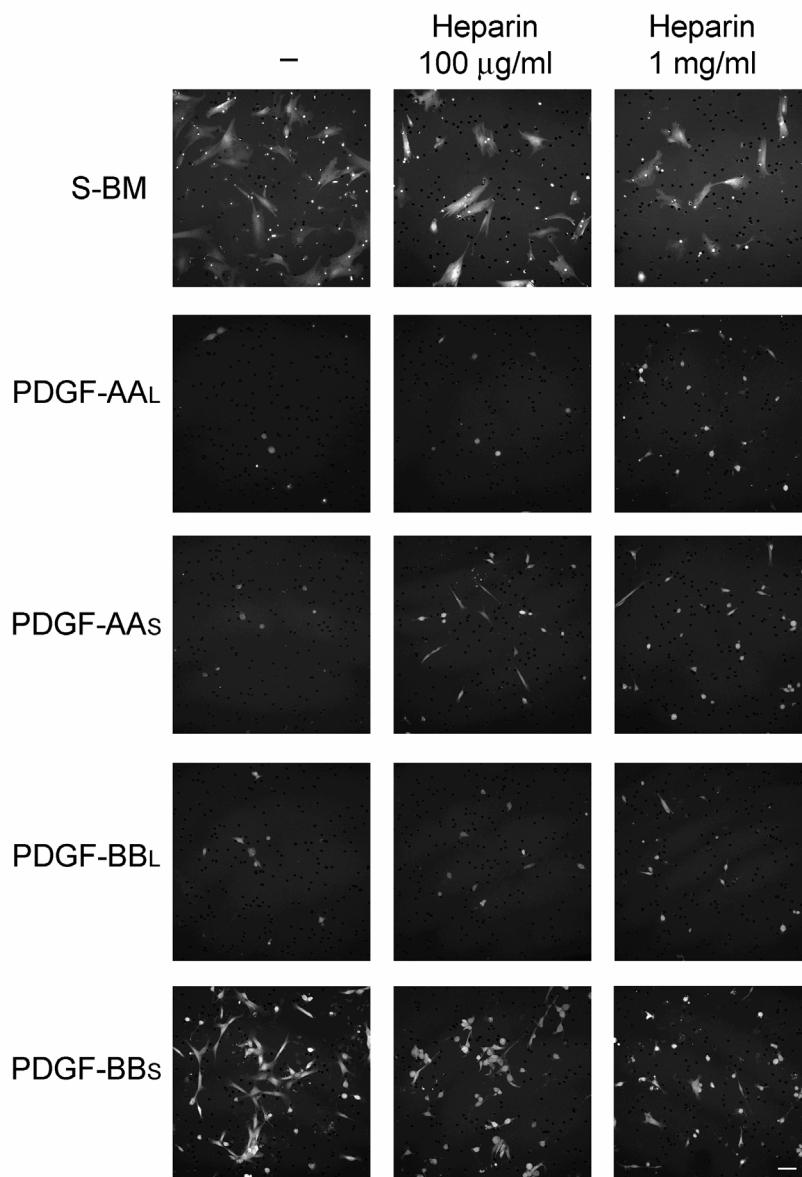
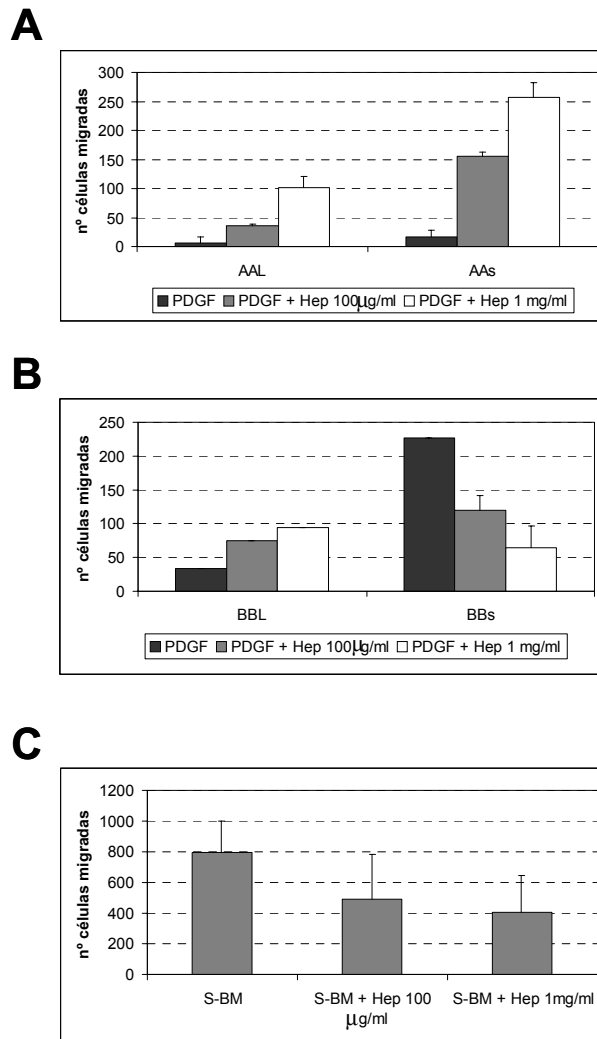


Figura 4.19. Efecto de la heparina en la trans migración de las hASMC inducida por S-BM y las isoformas de PDGF. Las hASMC quiescentes se tripsinizan y se siembran en insertos o *transwells* en BM (medio basal). Después de 2h de extensión celular, se tiñen con CMFDA y se les añade el S-BM (medio completo) o las isoformas de PDGF (50 ng/ml) en presencia o ausencia de heparina (100 $\mu\text{g/ml}$; 1 mg/ml) en el compartimiento inferior del *transwell* durante 20h. Posteriormente se fijan y se observan en el microscopio. Las imágenes que se presentan son proyecciones tridimensionales de tipo máximo obtenidas a partir de 5 secciones del microscopio confocal Olympus (Barra = 40 μm).



Reducción de la trans migración (%) en hASMC inducida por las isoformas de PDGF y S-BM

	BM	PDGF-AA _L	PDGF-AA _S	PDGF-BB _L	PDGF-BB _S	S-BM
Hep 100 µg/ml	-	-	-	-	47	37
Hep 1 mg/ml	17	-	-	-	71	49

Figura 4.20. Efecto de la heparina en la trans migración de las hASMC. Las hASMC deprivadas de suero se siembran en el compartimiento superior de los insertos o *transwells* y tras 2h de extensión celular, se tiñen con el marcador vital CMFDA (1 µM). En el compartimiento inferior del *transwell* se añaden las isoformas de PDGF (50 ng/ml) en ausencia /presencia de heparina (100 µg/ml; 1 mg/ml) durante 20h. El número total de células migradas se cuenta en el LSC (*laser scanning cytometer*). Los resultados son la media de duplicados y se representa la desviación estándar. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes.

A. Efecto de la heparina (100 µg/ml; 1 mg/ml) en la trans migración de las hASMC inducida por las isoformas PDGF-AA_L y PDGF-AA_S. B. Efecto de la heparina (100 µg/ml; 1 mg/ml) en la trans migración de las hASMC inducida por las isoformas PDGF-BB_L y PDGF-BB_S. C. Efecto de la heparina (100 µg/ml; 1 mg/ml) en la trans migración de las hASMC inducida por S-BM (medio completo).

La tabla inferior presenta los datos de inhibición (%) de la heparina en la trans migración de las hASMC inducida por el S-BM y las isoformas de PDGF. -: no hay inhibición.

Se observa que la heparina presenta un efecto activador de la migración en el caso de las isoformas de PDGF: PDGF-AA_L, PDGF-AA_S y PDGF-BB_L que inducen muy poca migración de las hASMC a través del *transwell*. En cambio, la heparina inhibe la migración inducida por el suero (S-BM) y por la isoforma PDGF-BB_S que son los factores de crecimiento que inducen mayor migración de las células. La inhibición de la heparina de la migración de las hASMC es dependiente de concentración.

4.7 Quimiocinesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF

4.7.1 Análisis de la quimiocinesis de las hASMC

La quimiocinesis o migración al azar de las hASMC se estudió a través de experimentos *time-lapse* o tiempo retardado en el microscopio confocal Leica TCS SP2 equipado con una cámara que permite una atmósfera de CO₂ y temperatura de 37°C. Las hASMC se resuspendieron en BM (medio basal) y se sembraron en placas con fondo de vidrio con y sin revestimiento de colágeno-I (10 µg/ml). Las hASMC se tiñen con el CMFDA (0.25 µM) y se obtienen imágenes en el microscopio confocal cada 10 min durante 21 horas. El análisis del movimiento de las células (*tracking*) se realizó en el programa Metamorph.

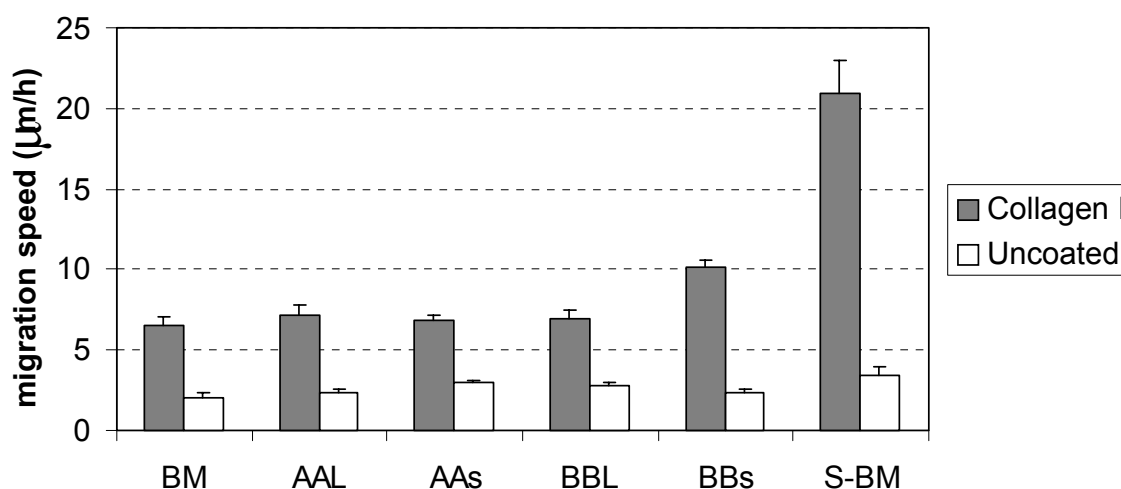


Figura 4.21. Quimiocinesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF y S-BM (medio completo). Las hASMC resuspendidas en BM (medio basal) se siembran en placas con fondo de vidrio sin revestimiento (*uncoated*) y con revestimiento de colágeno-I (10 µM) y tras 48h de extensión delular, se tiñen con CMFDA (0.25 µM). Se extrae el medio y se reserva en el caso de revestimiento con colágeno-I. Se añaden el S-BM o las isoformas de PDGF (50 ng/ml) en BM o en el medio reservado de las células sembradas en placas con colágeno-I. Se adquieren imágenes en el microscopio confocal Leica TCS-SP2 cada 10 min durante 21 horas (*time-lapse*). El movimiento de las células se analiza en el programa Metamorph. Se representa la velocidad de migración promedio de 15-20 células (µm/h). Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

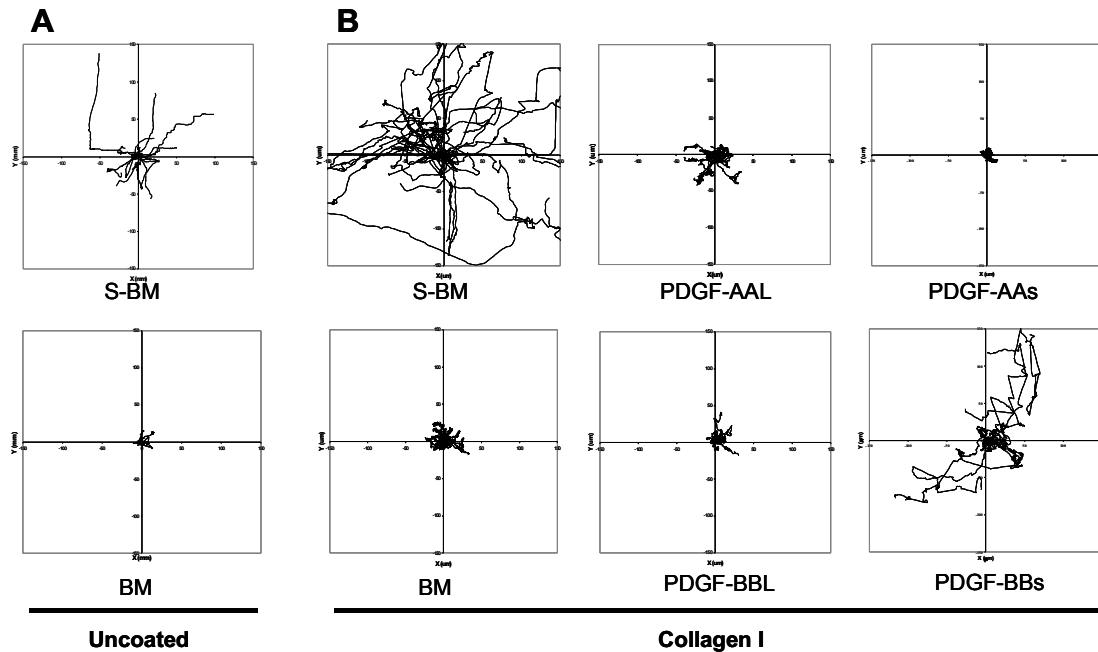


Figura 4.22. *Trayectorias de quimiotaxis de las hASMC*. Las trayectorias de migración al azar de las hASMC inducidas por el S-BM (medio completo) o las isoformas de PDGF (50 ng/ml) en BM (medio basal) se estudian a partir de las imágenes obtenidas en el experimento de *time-lapse* en el microscopio confocal Leica TCS SP2. Se analiza el movimiento de los centroides de las células en intervalos de 10 min durante 21 horas y se representan en un centro común. Las trayectorias indicadas representan los movimientos de 15 células.

A. hASMC sembradas en placas sin revestimiento. La división de la escala representa 50 μm . B. hASMC sembradas en placas con colágeno-I (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La división de la escala representa 50 μm .

Estos resultados permiten concluir que el revestimiento de colágeno-I aumenta la migración al azar basal de las hASMC. Los resultados demuestran que el PDGF-BB_S ($10 \pm 1.3 \mu\text{m}/\text{hora}$) y los factores presentes en el S-BM ($21 \pm 9.3 \mu\text{m}/\text{hora}$) en presencia de una matriz de colágeno son los que inducen mayor velocidad del movimiento de las hASMC. En la Figura 4.22 se pueden observar las trayectorias del movimiento al azar de las células en las cuales el PDGF-BB_S y el S-BM son los factores de crecimiento que activan en mayor grado la quimiotaxis en las hASMC.