

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Facultad de Ciencias  
Escuela de Bioquímica

# **Bradicinina 1-5 activa el receptor B<sub>1</sub> de Cininas e induce la Fosforilación de Mapk en células Epidérmicas humanas en cultivo**

## **2. INTRODUCCION**

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en  
Bioquímica y al Título profesional de Bioquímico.

Profesor Patrocinante: Dr. Carlos Figueroa - Instituto de Histología y Patología -  
Facultad de Medicina.

**Carola Elizabeth Matus Velásquez**

**ValdiviaChile 2003**



# Contenido

Dedicatoria .

Agradecimientos .

1. RESUMEN .

2. INTRODUCCION . 1

    2.1 Sistema Calicreína-Cinina . 1

    2.2 Receptores de cininas . 2

    2.3 Receptores de cininas en queratinocitos humanos . 4

    2.4 Objetivos específicos . . 5

3. MATERIALES Y METODOS .

4. RESULTADOS . .

5. DISCUSION .

BIBLIOGRAFIA .



## 2. INTRODUCCION

### 2.1 Sistema Calicreína-Cinina

Las calicreinas son un grupo de serina-proteasas que se pueden encontrar en células glandulares y epiteliales (glándula salival, páncreas, glándulas del tracto respiratorio, hipófisis, riñón), neutrófilos y fluidos biológicos. La principal acción de estas enzimas es liberar péptidos vasoactivos, llamados cininas. Las cininas son péptidos biológicamente activos, de 9 a 10 aminoácidos que actúan en un gran número de procesos biológicos tales como hipotensión, aumento de la permeabilidad vascular y dolor. Estos péptidos son liberados, por las calicreinas, desde sustratos endógenos de alto peso molecular conocidos como cininógenos. Estos son proteínas multifuncionales que pueden además actuar como inhibidores de cisteína-proteasas y participar, como el cininógeno de alto peso molecular, en la cascada de la coagulación (Bhoola y col., 1992). La vida media de las cininas es muy corta ya que son inactivadas rápidamente por peptidasas (cininasas) que se encuentran en tejidos y sangre (Erdős, 1990). Uno de los productos del cininógeno de alto peso molecular es el nonapéptido bradisinina (BK), formado en el plasma durante el proceso de la coagulación, que es rápidamente degradado por enzimas tales como carboxipeptidasa N (cininasa I), la enzima convertidora de angiotensina I (ACE o cininasa II), endopeptidasa neutra (NEP, encefalinaasa o antígeno CALLA) y aminopeptidasa P, generándose péptidos como Des- [Arg<sup>9</sup>] -BK, Des-

-Arg<sup>9</sup>]-BK (BK1-7), Arg-Pro-Pro (BK1-3) y Arg-Pro-Pro-Gly-Phe (BK1-5), entre otros (Bhoola y col., 1992). Una vez formadas, DBK y BK1-7 también son degradadas a BK1-5 (Shima y col., 1992). De los péptidos producidos por la degradación de BK, sólo algunos como des-[Arg<sup>9</sup>]-BK, que se une a los receptores de tipo B<sub>1</sub> de cininas, son activos postulándose que los demás fragmentos serían inactivos (Fig.1).

Los efectos biológicos generados por las cininas están mediados al menos por dos tipos de receptores: B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (Bhoola y col., 1992). El receptor B<sub>2</sub> media la mayor parte de los efectos producidos por las cininas y es activado tanto por BK como por Lisina-bradicinina (LBK).

En contraste, el receptor B<sub>1</sub> es activado sólo por Des-[Arg<sup>9</sup>]-bradicinina y Lis-des-[Arg<sup>9</sup>]-bradicinina productos de degradación de BK y LBK, respectivamente, generados por la acción de carboxipeptidasas N y M que remueven la Arg<sup>9</sup> del extremo carboxilo del péptido (Erdös, 1990).

Los mecanismos de transducción gatillados por la unión cinina-receptor implican en general, la activación de un canal iónico o de segundos mensajeros, tales como nucleótidos cíclicos, fosfoinositoles y Ca<sup>2+</sup>. Se ha demostrado la presencia del receptor B2 en piel y cultivos primarios de queratinocitos humanos por estudios directos de unión ligando-receptor y mediante autoradiografía (Schremmer-Danninger y col., 1995). Parte de los eventos que tienen lugar una vez que BK o LBK se unen al receptor B<sub>2</sub>, son desconocidos. Sin embargo, algunos estudios han demostrado la capacidad de BK de producir fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en diferentes tipos celulares, incluidos los queratinocitos, (Jaffa y col., 1997; Velarde y col., 1999; Naidu y col., 1999; Greene y col., 2000).

## 2.2 Receptores de cininas

Los receptores B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> de cininas presentan sólo un 36% de homología entre ellos (Schanstra y col., 1999). El receptor B<sub>2</sub> es expresado constitutivamente por varios tipos celulares como células endoteliales, células musculares vasculares y del sistema gastrointestinal, células renales tubulares, mastocitos y fibroblastos, entre otros (Bhoola y col., 1992; Figueroa y Müller-Esterl, 1998). En cambio, el receptor B<sub>1</sub> es inducido bajo condiciones de inflamación, daño tisular o durante el cultivo celular (Marceau y col., 1998) y media junto al tipo B<sub>2</sub> efectos proinflamatorios tales como edema, dolor y movimiento de leucocitos (Ahluwalia y Perratti, 1999; 1996).

Como se mencionó anteriormente, el receptor B<sub>2</sub> es activado por BK y LBK, fue clonado desde la línea celular CCD-16Lu (fibroblastos de pulmón humano) determinándose que es una proteína de 364 aminoácidos perteneciente a la familia de receptores que poseen 7 dominios transmembrana y están acoplados a proteína G. Con el tiempo se ha determinado además que existe gran homología (más de 80 %) entre receptores B<sub>2</sub> de diferentes especies (Hess y col., 1992).

Toda la evidencia disponible indica que el receptor B<sub>1</sub> es activado sólo por Des-[Arg<sup>9</sup>]-bradicinina (DBK) y Lis-des-[Arg<sup>9</sup>]-bradicinina (LDBK), formados por la acción de las enzimas ya antes mencionadas. Para este receptor el ligando clásico es DBK, aunque en células provenientes de conejo y humano LDBK es 1000 veces más potente que DBK (Menke y col., 1994). El receptor B<sub>1</sub> fue aislado y clonado desde una biblioteca de cDNA de fibroblasto de pulmón humano (fibroblastos IMR-90), para luego continuar con las secuencias de conejo, ratón y rata (Menke y col., 1994; Ahluwalia y Perretti, 1999). Como producto de su clonación se pudo constatar que, el receptor B<sub>1</sub> al igual que B<sub>2</sub>, posee 7 dominios de transmembrana característicos de los receptores acoplados a proteína G, además de exhibir tres sitios de N-glicosilación (Menke y col., 1994). Sin embargo, y a diferencia del receptor B<sub>2</sub>, existe poca homología entre receptores B<sub>1</sub> de diferentes especies.

Los receptores de cininas gatillan la vía del inositol trifosfato a través de fosfolipasa C y/o la vía del ácido araquidónico, a través de la activación de fosfolipasa A<sub>2</sub> (Burch y Axelrod, 1987). Estas cascadas son iniciadas y sostenidas por un rápido aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, óxido nítrico y guanosin monofosfato cíclico (Burch y Kyle, 1992). Los mediadores intracelulares activados por BK y LBK también son activados por las formas hidroxiladas de ambos péptidos [Hyp<sup>3</sup>]-BK y [Hyp<sup>3</sup>]-lis-BK (Dengler y col., 1990).

Las señales recibidas desde la superficie de una célula por receptores acoplados a proteína G son conducidas al núcleo, en donde alteran la expresión de genes específicos y por lo tanto, alteran el comportamiento de la célula. Existen varias proteínas que interactúan en la señalización intracelular, estas proteínas son de dos tipos: proteínas que son fosforiladas por quinasas ó proteínas que son activadas por la unión de guanosin trifosfato. En ambos casos, las proteínas adquieren fosfatos en su estado activado y los pierden cuando la señal decae. Esas proteínas, a su vez, generalmente provocan la fosforilación de otras proteínas como parte de una cascada de fosforilación. Estas cascadas de fosforilación son mediadas por dos clases principales de proteínas quinasas: *serina/treonina quinasas*, las cuales fosforilan proteínas en serinas y treoninas, y *tirosinas quinasas*, que fosforilan proteínas en tirosinas (Alberts y col., 2002).

Entre las proteínas que son fosforiladas se encuentran las proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPK que corresponden al grupo de serina-treonina quinasas que son rápidamente activadas en respuesta a la estimulación con factores de crecimiento y/o diferenciación. En células de mamíferos la familia de MAPK incluye a quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (Erk1 y Erk2 o p42<sup>mapk</sup> y p44<sup>mapk</sup>), las quinasas *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal* (JNK, también conocidas como proteínas quinasas activadas por estrés, SAPK) y p38<sup>mapk</sup> (Cobb y col., 1995). Ellas integran múltiples señales que provienen de una variedad de segundos mensajeros, induciendo finalmente la proliferación de algún tipo celular o su diferenciación (Robinson y col., 1997; Su y col., 1996). Las MAPK activadas translocan al núcleo, donde se cree regulan la expresión de factores de transcripción tales como *c-fos* a través de la fosforilación del factor de transcripción p62<sup>TCF</sup> (Gille y col., 1992).

Los mecanismos por los cuales los factores de crecimiento activan Erk1 y Erk2 para controlar la diferenciación y proliferación celular han sido parcialmente aclarados. Se

inician por la unión de la hormona a un receptor de membrana, que a su vez resulta en la activación de la proteína G monomérica, *Ras*. La proteína *Ras* activada, a su vez, activa *Raf-1* el cual fosforila a MAPKK o MEK. Una vez fosforilada, MEK fosforila a MAPK en residuos de treonina y tirosina. Las MAPK fosforiladas migran al núcleo en donde regulan la actividad de una variedad de factores nucleares, los cuales finalmente controlan la expresión de genes esenciales para la proliferación/diferenciación (Davis, 1993) (Fig. 2).

## **2.3 Receptores de cininas en queratinocitos humanos**

en el año 1995, se demostró, la presencia del receptor B<sub>2</sub> en piel y cultivos primarios de queratinocitos humanos, por estudios directos de unión ligando-receptor utilizando técnicas autorradiográficas (Schremmer-Danninger y col., 1995). Estos estudios mostraron que en la epidermis, el receptor B<sub>2</sub> se localiza predominantemente en el estrato basal tanto en piel adulta como de recién nacidos (Schremmer-Danninger y col., 1995). En contraste a la unión de ligandos radiactivos, el uso de anticuerpos dirigidos contra dominios intra- y extra-celulares del receptor B<sub>2</sub>, ha mostrado que la proteína inmunoreactiva se puede encontrar prácticamente en todos los estratos de la epidermis humana (Figuroa y Müller-Esterl, 1998).

Estudios previos han mostrado que BK participa tanto en la fisiología de la piel como en su patofisiología. Pequeñas cantidades de BK aplicadas subcutáneamente pueden inducir efectos a corto término semejantes a una respuesta inflamatoria, tales como el aumento de la permeabilidad vascular, dilatación arteriolar, edema y dolor (Ferner y col., 1989; Treede y col., 1990). Entre los componentes celulares de la piel, en particular los queratinocitos participan activamente en los procesos inflamatorios, liberando mediadores proinflamatorios tales como ácido araquidónico y sus metabolitos, por ejemplo inducidos por radiación ultravioleta y contacto con alérgenos (Talwar y col., 1990; Barker y col., 1991).

Como se ha demostrado en líneas celulares de queratinocitos (HaCaT), el receptor B<sub>2</sub> esta acoplado a proteína G sensible a toxina pertusis y la unión con el ligando induce la liberación de ácido araquidónico y otros segundos mensajeros tales como AMPc, inosítoles fosfato o diacilglicerol (Kast y col., 1991; 1993; Johnson y col., 1992; Rosenbach y col., 1993; Haase y col., 1997 a, b). Por otra parte, cuando se estimulan queratinocitos en cultivo con BK, también son capaces de sobre-expresar la isoforma neuronal de óxido nítrico sintetasa (Kang-Rotondo y col., 1996).

La importancia de las cininas para la fisiología de la piel se basa en que en este órgano se ha descrito además, la expresión del RNA mensajero de ambos receptores (Schremmer-Danninger y col., 1999), así como inmunoreactividad, tanto para calicreína como para sus sustratos, los cininógenos, en la porción secretora de las glándulas sudoríparas (Poblete y col., 1991).

En estudios previos realizados en el laboratorio de patología de la Universidad Austral de Chile, se ha demostrado que queratinocitos humanos en cultivo presentan



receptores de BK, mayoritariamente receptor  $B_2$  (Vidal y col., 2003a). También se ha observado que queratinocitos estimulados con LBK muestran la activación de una vía que involucra un grupo de proteínas que están sufriendo fosforilación en tirosina, la activación de MAPK (Erk1 y Erk2) y la participación de alguna isoforma de PKC y de MEK en estas señales de transducción. Del mismo modo se encontró que LBK induce una estimulación moderada de la diferenciación del queratinocito en cultivo (Vidal y col., 2003a).

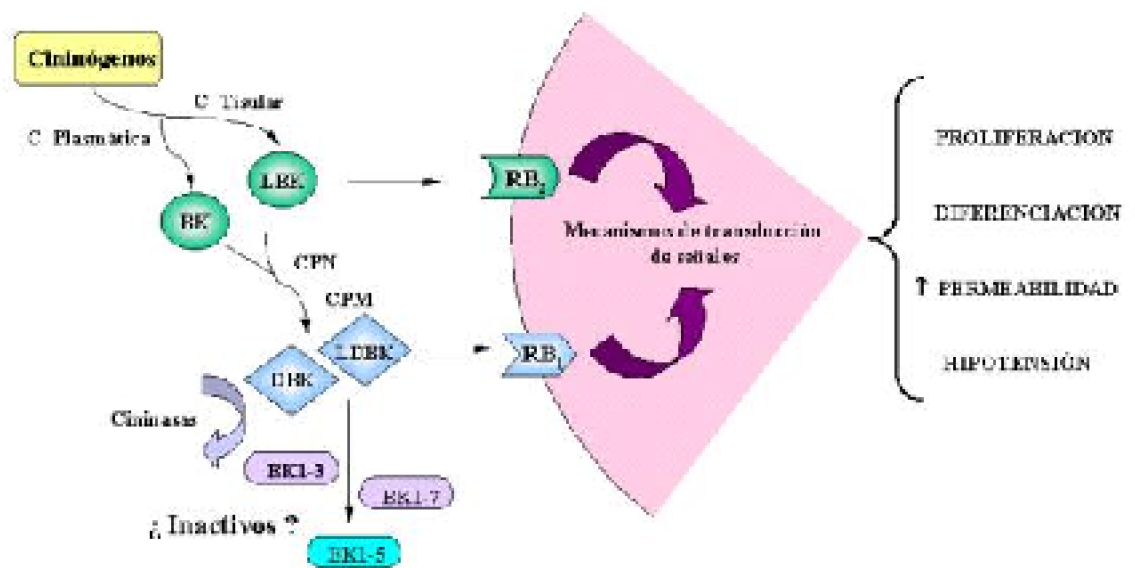
Hasta el momento los péptidos producidos por la degradación de BK y LBK tales como BK1-7, BK1-5 y BK1-3 entre otros, se han considerado inactivos. Uno de estos péptidos, BK1-5, fue identificado como el péptido de degradación más estable de BK generado *in vivo* en el plasma humano con una vida media terminal de 86 a 101 minutos (Shima y col., 1992; Murphey y col., 2000). Otros trabajos han demostrado además, que BK1-5 *in vitro* evita la agregación plaquetaria inducida por trombina a dosis suprafisiológicas (Hasan y col., 1996). Un estudio separado *in vivo*, muestra que BK1-5 (600 $\mu$ M) tiene una eficacia comparable a la de aspirina (4,6 mg/Kg) en prevenir la oclusión vascular en un modelo canino de trombosis coronaria (Hasan y col., 1999). también se ha estudiado su actividad farmacológica en un modelo de shock endotóxico donde BK1-5 tiene un efecto protector de la acción de LPS (Morinelli y col., 2001).

No obstante, no existen trabajos previos que analicen, por un lado, el tipo de receptor activado por BK1-5 y por otro, si su actividad es más amplia que la hasta ahora descrita, considerando que su vida media en plasma es cerca de 300 veces la de BK o LBK. Tampoco se ha determinado si BK1-5 gatilla vías de transducción similares a las desencadenadas por los agonistas  $B_2$  intactos. Por otra parte, la medición de BK1-5 en exudados inflamatorios a través de ELISA muestran que este péptido es un buen indicador de la proporción de cininas generadas *in vivo* durante el curso de estos procesos (Majima y col., 1996).

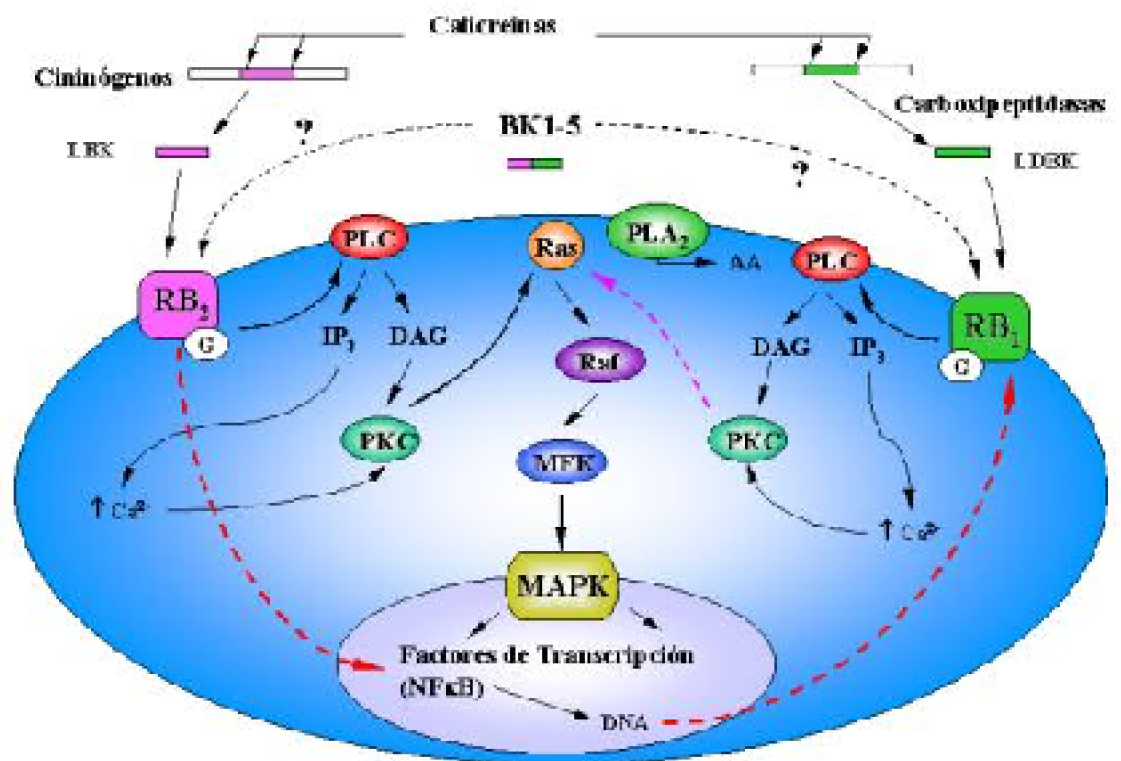
Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue investigar si BK1-5 es capaz de activar vías de señalización celular y si en esta activación participan receptores de tipo  $B_1$  o  $B_2$  de cininas.

## 2.4 Objetivos específicos

Los objetivos del presente trabajo de tesis fueron: *i*) realizar un estudio comparativo de la acción de BK1-5 y agonistas  $B_1$  y  $B_2$  sobre la fosforilación de una proteína clave de señalización celular como MAPK (Erk1 y Erk2) utilizando queratinocitos humanos en cultivo y *ii*) determinar si la fosforilación de MAPK inducida por BK1-5 depende de la activación de receptores  $B_1$  o  $B_2$  de cininas.



**FIGURA 1. Representación esquemática de la vía de formación y degradación de cininas.** Las cininas (BK y LBK) se forman por acción de las calicreínas plasmática y tisular sobre los cininógenos. Estos péptidos actúan sobre receptores B<sub>2</sub> de cininas (RB<sub>2</sub>) y son degradados rápidamente por cininasas (Carboxipeptidasas N, CPN y M, CPM) que remueven la Arg<sup>7</sup> generando DBK y LDBK. Estos últimos actúan sobre receptores B<sub>1</sub> de cininas (RB<sub>1</sub>). Los agonistas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> pueden ser degradados también por otras cininasas para generar directamente fragmentos como BK1-5, BK1-7 y BK1-3, entre otros.



**FIGURA 2. Esquema de las vías de señalización descritas para agonistas de**

*receptores  $B_1$  y  $B_2$  de cininas.*