



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

**Escuela de Bioquímica**

**Profesor Patrocinante:**  
**Dra. Alejandra Vidal**  
**Instituto de Histología y Patología**  
**Facultad de Medicina**

**Profesor Co-Patrocinante:**  
**Dr. Miguel Concha**  
**Instituto de Histología y Patología**  
**Facultad de Medicina**

**Identificación de factores de transcripción en  
Queratinocitos humanos estimulados con Arginina-  
Vasopresina y Lisina-Bradicinina**

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

**María Francisca Pavicic Rojas**

Valdivia Chile 2003

## **Agradecimientos**

A través de estas líneas quisiera expresar mis sinceros agradecimientos a todas las personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de esta Tesis. A mis profesores patrocinantes, la Dra. Alejandra Vidal y el Dr. Miguel Concha, quienes me dieron la posibilidad de desarrollar mi trabajo en su laboratorio, guiándome, apoyándome y aconsejándome en todo momento.

A mis padres, Juan y Alicia, por su apoyo incondicional, fortaleza y cariño. Agradezco también a mis amigos Carola, Pamela y Angel, quienes siempre con su buen humor y disponibilidad hicieron que la labor de algunos días fuera menos pesada. También quiero agradecer al Dr. Carlos Figueroa por sus consejos, opiniones y aportes para el mejoramiento de este trabajo, y a todas las personas del Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral por su cariño y apoyo entregado.

Finalmente y en especial quiero dar gracias a mi esposo Milton y a mi hijo Tomás por su paciencia, comprensión y amor que me han entregado siempre.

Esta Tesis fue financiada por el Proyecto Fondecyt Líneas Complementarias N° 8980002.

**INDICE DE CONTENIDOS**

	<b>PÁGINA</b>
Indice de figuras	IV
Indice de abreviaturas	VI
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
2.1 Generalidades	3
2.2 Péptidos vasoactivos	5
2.2.1 Cininas	5
2.2.2 Arginina vasopresina	7
2.3 Antígeno de diferenciación leucocitaria CD40	8
2.4 Factores reguladores de la transcripción	9
2.4.1 Ciclinas	9
2.4.2 NF- $\kappa$ B	11
2.4.3 Egr-1	12
2.4.4 c-fos	12
2.5 Objetivos	14

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
3.1 Equipos	17
3.2 Medios de cultivo	17
3.3 Anticuerpos y péptidos	18
3.4 Aislamiento de células epidérmicas y cultivo de queratinocitos humanos	19
3.5 Activación de queratinocitos humanos en cultivo con LBK , AVP	20
3.6 Obtención de extractos proteicos citosólicos y nucleares de células epidérmicas humanas	21
3.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia y quimioluminiscencia	22
3.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida	22
3.7.2 Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa	23
3.7.3 Quimioluminiscencia	23
3.8 Visualización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B p65 en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK y AVP	24
3.9 Identificación de (pro)filagrina en queratinocitos humanos estimulados con AVP y LBK	25
4.0 Análisis de imagen y gráficos	26

<b>4. RESULTADOS</b>	27
4.1 AVP induce en queratinocitos la expresión de los genes de respuesta temprana c-fos y Egr-1	27
4.2 AVP induce en queratinocitos en cultivo moderada expresión de ciclina D1 y no de ciclina A	28
4.3 LBK induce expresión de c-fos y Egr-1 en queratinocitos humanos	28
4.4 LBK induce en queratinocitos en cultivo la expresión de ciclina D1 pero no de ciclina A	29
4.5 LBK, pero no AVP, induce la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en queratinocitos en cultivo	29
4.6 LBK, pero no AVP, induce la expresión de (pro)filagrina en queratinocitos en cultivo	31
<b>5. DISCUSIÓN</b>	43
5.1 Efecto de AVP sobre genes de respuesta temprana y ciclinas	43
5.2 Efecto de LBK sobre genes de respuesta temprana y ciclinas	45
5.3 Efecto de LBK y AVP sobre la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B	47
5.4 Efecto de AVP y LBK sobre la expresión de (pro)filagrina	49
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	51

## INDICE DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1:</b> Representación esquemática de probables vías implicadas en los queratinocitos humanos luego de la activación del receptor B <sub>2</sub> de cininas y V <sub>1</sub> vasopresina	15
<b>Figura 2:</b> Representación esquemática de la interacción entre ciclinas y cdks en la regulación del ciclo celular	16
<b>Figura 3:</b> Expresión de c-fos en queratinocitos en cultivo estimulados con AVP	32
<b>Figura 4:</b> Expresión de Egr-1 en queratinocitos en cultivo estimulados con AVP	33
<b>Figura 5:</b> Expresión de ciclina D1 en queratinocitos en cultivo estimulados con AVP	34
<b>Figura 6:</b> Expresión de ciclina A en queratinocitos en cultivo estimulados con AVP	35
<b>Figura 7:</b> Expresión de c-fos en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK	36
<b>Figura 8:</b> Expresión de Egr-1 en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK	37
<b>Figura 9:</b> Expresión de ciclina D1 en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK	38

<b>Figura 10:</b> Expresión de ciclina A en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK	39
<b>Figura 11:</b> Visualización de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en cultivo de queratinocitos humanos	40
<b>Figura 12:</b> Identificación de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en queratinocitos humanos estimulados con LBK y AVP	41
<b>Figura 13:</b> Identificación de (pro)filagrina en queratinocitos humanos en cultivo estimulados con AVP, LBK y M89	42

**INDICE DE ABREVIATURAS**

**ACTH:** Hormona adrenocorticotrópica

**AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico

**AP-1:** Proteína de activación 1

**AVP:** Arginina-vasopresina

**BK:** Bradicinina

**BSA:** Albúmina sérica de bovino

**cdks:** Quinasas dependientes de ciclinas

**DAG:** Diacilglicerol

**DK-SFM:** Defined Keratinocyte-serum free Medium

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO:** Dimetil Sulfoxido

**DNA:** Acido desoxirribonucleico

**EDTA:** Acido etilendiaminotetraacético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**EGTA:** Etilene glycol bis-( $\beta$ -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetracetic acid

**ERKs:** Quinasas reguladas por señales extracelulares

**HBSS:** Hank's Balanced Salt Solution

**I $\kappa$ B:** Inhibidor de  $\kappa$ B

**IL-1:** Interleuquina 1

**INF-g:** Interferon  $\gamma$

**IP3:** Inositol trifosfato



**IP3-K:** Inositol trifosfato quinasa

**kDa:** Kilodalton

**KGF:** Factor de crecimiento de queratinocitos

**LBK:** Lisina-bradicinina

**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos

**MAPKK:** MAPK quinasa

**MEK:** MAPK/ERK

**mRNA:** RNA mensajero

**NF-κB:** Factor nuclear -κB

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaqueta

**PKC:** Proteína quinasa C

**PLC:** Proteína lipasa C

**PMA:** Forbol 12-miristato 13-acetato

**PMSF:** Phenylmethylsulfonyl fluoride

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**SFB:** Suero fetal de bovino

**TBS:** Tampón tris salino

**TNF-α:** Factor de necrosis tumoral α

**TGF-α:** Factor transformador del crecimiento α

**TGF-β:** Factor transformador del crecimiento β

**TPA:** Esteres de forbol

**TTBS:** Tampón tris-tween salino

## 1. RESUMEN

La epidermis es un epitelio estratificado queratinizado, cuya capa basal está formada de células madres o progenitoras. Estas células al entrar en división inician un programa de diferenciación altamente secuencial que las conduce progresivamente a la diferenciación terminal. Sin embargo, los factores que intervienen en la regulación de la proliferación y diferenciación de los queratinocitos humanos no han sido totalmente dilucidados.

En el presente trabajo se estudió en cultivos de queratinocitos humanos la acción de los receptores  $V_1$  de vasopresina y  $B_2$  de cininas, sobre la expresión de factores reguladores de la transcripción tales como c-fos, Egr-1, ciclina A y D1 y la translocación nuclear del factor NF- $\kappa$ B, así como la expresión de (pro)filagrina, un marcador de la diferenciación terminal de las células epidérmicas. Para ello se estimularon cultivos subconfluentes de queratinocitos con 100 nM de arginina-vasopresina (AVP) y lisina-bradicinina (LBK) por diferentes períodos de tiempo los cuales fueron procesados mediante Western-blotting. Los resultados obtenidos demuestran que tanto AVP y LBK inducen la expresión de genes de respuesta temprana como c-fos y Egr-1 y la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular como ciclina D1. Además, LBK induce la translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y ejerce un efecto moderado en la expresión de (pro)filagrina.

Estos resultados sugieren que la activación de los receptores  $V_1$  de vasopresina y  $B_2$  de cininas por sus ligandos específicos inducen segundas señales más bien restringidas a cada receptor. Mientras, la activación del receptor  $V_1$  de vasopresina puede estar asociada a proliferación de los queratinocitos, el receptor  $B_2$  de cininas induce una limitada diferenciación de éstos.

## SUMMARY

Basal cells from human epidermis correspond to progenitor cells which under specific stimulation enter to cellular cycle and start a highly sequential program of differentiation that progressively lead them to terminal differentiation. However, the regulation of both keratinocyte proliferation and differentiation has not been completely elucidated.

At the present work we have studied the effect of vasopressin V<sub>1</sub> and kinin B<sub>2</sub> receptor triggering on c-fos, Egr-1, cyclin A and D1 expression and nuclear translocation of the transcription factor NF-κB in the human keratinocytes. In addition, we wonder if vasopressin V<sub>1</sub> and kinin B<sub>2</sub> receptor were or not involved in (pro)filaggrin expression, a marker of keratinocyte terminal differentiation. To this purpose sub-confluent cultures of human keratinocytes were stimulated with the specific ligands to vasopressin V<sub>1</sub> and kinin B<sub>2</sub> receptors arginine-vasopressin (AVP) and lysine-bradykinin (LBK), respectively, for different periods of times. Proteins extracts were separated by SDS-PAGE and processed to Western-blotting. Second signal were recognized using specific antibodies revealed with a chemiluminescence method. The results shown that AVP and LBK induce the expression of genes of early response c-fos and Egr-1 and the cell cycle regulatory protein cyclin D1. Moreover, LBK but not AVP stimulated nuclear translocation of NF-κB and exerted a moderate effect on (pro)filaggrin expression.

These results suggest that the activation of vasopressin V<sub>1</sub> and kinin B<sub>2</sub> by specific ligands induce second signals rather restricted to each receptor. Whereas activation of vasopressin V<sub>1</sub> receptors could be associated to keratinocytes proliferation, kinin B<sub>2</sub> receptors induce a limited keratinocyte differentiation.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Generalidades

La epidermis es un epitelio estratificado queratinizado que se encuentra en constante renovación. Su principal población celular la constituyen los queratinocitos, los que están organizados en: los estratos basal, espinoso, granuloso y córneo que corresponden a etapas progresivas de diferenciación.

La capa basal o estrato germinativo está constituida por células madres o progenitoras, las que al entrar en división celular inician un programa de diferenciación altamente secuencial que las conduce progresivamente a la diferenciación terminal. Durante este proceso, los queratinocitos se desplazan progresivamente desde el estrato basal hasta el estrato córneo desde donde se descaman como escamas cornificadas. La diferenciación de la epidermis está genéticamente programada pero, además, la serie de eventos morfológicos y metabólicos que ocurren están estrechamente regulados por factores sistémicos y ambientales. La diferenciación es vulnerable a alteraciones que pueden ocurrir en diferentes niveles de la vía de la queratinización.

Entre los principales factores de crecimiento de la epidermis se han identificado el factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor, EGF), los factores transformadores del crecimiento- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ ) y - $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento de queratinocitos (keratinocyte growth factor, KGF). Mientras que EGF, TGF- $\alpha$  y KGF actúan como mitógenos, favoreciendo la proliferación de los queratinocitos, TGF- $\beta$  actúa inhibiendo la síntesis de DNA y la mitosis pero promoviendo la diferenciación. Otros factores reguladores involucrados en la diferenciación de los queratinocitos son el ácido retinoico y la forma activa de

la vitamina D<sub>3</sub> (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>), que actúan a través de receptores específicos. Un factor extensamente estudiado en la regulación de la proliferación y diferenciación de los queratinocitos es el calcio (Ca<sup>2+</sup>). Evidencias *in vitro* han demostrado que una baja concentración de calcio promueve la proliferación de los queratinocitos y un aumento de éste induce su diferenciación (Haake y col, 2001).

La mayoría de estos factores, si no todos, actúan mediante receptores de membrana específicos que activan señales secundarias, las cuales corresponden principalmente a procesos de fosforilación de proteínas, produciendo como resultado activación transcripcional (Mitev y Miteva, 1999). La fosforilación de proteínas parece tener dos funciones principales. Por un lado es el principal mecanismo de respuesta a señales extracelulares, como hormonas y factores de crecimiento y por otro, es responsable de los eventos que ocurren en cada etapa del ciclo celular, tales como síntesis de DNA y mitosis (Mitev y Miteva, 1999). Este mecanismo de señales es iniciado por la unión ligando-receptor, resultando en la activación de proteínas monoméricas G, entre ellas la proteína Ras. Esta proteína, una vez activada, inicia una cascada de reacciones que producen la fosforilación de otras proteínas en el citoplasma (Kazanietz y Blumberg, 1996). Así, la fosforilación del proto-oncogen Raf-1, fosforila a las MEK o MAPKK, y éstas a su vez activan a las MAPK, proteínas que pertenecen a la familia de las serinas-treoninas quinasas, que son rápidamente activadas en respuesta a la estimulación de factores de crecimiento. Una vez fosforiladas, las MAPK migran al núcleo donde activan varios factores nucleares, tales como c-fos, c-jun y ELK-1, que controlan la expresión de genes esenciales para la proliferación celular (Davis, 1993).

Clásicamente la interacción ligando-receptor ha sido asociada a un producto final bien conocido -especialmente por los fisiólogos- por ej. la conjugación vasopresina/receptor V<sub>1a</sub>

provoca la contracción del músculo liso. Sin embargo, es posible proponer que la función específica activada por la unión ligando-receptor estimula procesos previos de proliferación y diferenciación celular que desembocan finalmente en el efecto clásico conocido.

A continuación se analizan ciertas moléculas cuya actividad biológica está asociada a la inducción de la proliferación y diferenciación celular pero cuyo efecto es, no obstante, escasamente conocido en la epidermis.

## **2.2 Péptidos vasoactivos**

### **2.2.1 Cinas**

Las cininas son potentes oligopéptidos vasoactivos que pueden actuar como mediadores en una variedad de enfermedades inflamatorias de la piel (Coutant y col, 1996). Se originan a partir de precursores proteicos plasmáticos llamados cininógenos por acción de la enzima calicreina, formando bradicinina (BK) o lisina-bradicinina (LBK). Pueden liberarse en sitios de inflamación y de injuria, causando dolor, vasodilatación, aumento de la permeabilidad y contracción del músculo liso (Ferner y col, 1989; Treede y col, 1990).

Las cininas producen numerosos efectos biológicos a través de la activación de receptores de membrana específicos unidos a proteína G. Esta activación produce la estimulación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, generando mediadores pro-inflamatorios como la prostaglandina E<sub>2</sub> y estimulando la fosfolipasa C que conduce a la formación de segundos mensajeros como inositol 1, 4, 5- trifosfato y diacilglicerol. Estos inducen, respectivamente, la movilización de calcio intracelular y activación de proteína quinasa C (Coutant y col, 1996).

Se han identificado al menos dos tipos de receptores para cininas: B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (Bhoola y col, 1992). El receptor B<sub>1</sub> es expresado generalmente en condiciones de estrés e inflamación y su expresión es sobre-estimulada por citoquinas tales como interleuquina-1 $\beta$  y TNF (Marceau, 1996). B<sub>1</sub> es activado por des-[Arg<sup>9</sup>]-bradicinina y Lis-des-[Arg<sup>9</sup>]-bradicinina, un producto de degradación de bradicinina generado por las carboxipeptidasas N y M que remueven la arginina ubicada en el extremo carboxiloterminar del péptido (Erdös, 1990). En cambio, el receptor B<sub>2</sub> está involucrado en la mayoría de los efectos biológicos producidos por las cininas, es decir regulación del tono vascular, hemodinámica renal y crecimiento celular (Bhoola y col, 1992), y es activado tanto por bradicinina como por lisina-bradicinina.

Aunque los eventos que se desencadenan como consecuencia de la unión de BK a su receptor, son en su mayoría desconocidos, existen evidencias que BK tiene la capacidad de producir fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y activación de MAPK en diferentes tipos celulares (Jaffa y col, 1997; Velarde y col, 1999; Naídu y col, 1999; Greene y col, 2000). Por otra parte, recientemente se ha demostrado la presencia del receptor B<sub>2</sub> en piel y cultivos primarios de queratinocitos humanos. Este receptor se localiza en la epidermis y se distribuye principalmente en el estrato basal de ésta (Schremmer-Danninger y col, 1995). Se ha observado en cultivos de queratinocitos humanos normales estimulados por diferentes períodos de tiempo con LBK, fosforilación de MAPK en forma sostenida y su translocación del citoplasma al núcleo (Vidal y col, 2003). Este tipo de estimulación sostenida de las MAPK estaría relacionada con procesos de diferenciación celular (Harada y col, 2001). Además, la estimulación de queratinocitos humanos HaCat con BK produce un aumento de los niveles de expresión del mRNA para los genes de respuesta temprana c-fos y c-myc (Countant y Ryder, 1996) así como

fosforilación tirosina-dependiente de proteínas (Countant y col, 1995; Schremmer-Danninger y col, 1998) (Fig. 1).

### **2.2.2 Arginina vasopresina**

Arginina vasopresina (AVP), conocida también como hormona antidiurética, es un nona péptido cíclico involucrado en una variedad de acciones. En efecto, corresponde a una hormona vasoconstrictora y es un potente péptido mitogénico.

AVP ejerce sus acciones a través de la unión a receptores de membrana pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteína G. Se han descrito al menos tres tipos de receptores que han sido clasificados de acuerdo a su perfil farmacológico y mecanismo transduccional. Estos receptores se conocen como  $V_{1a}$ ,  $V_{1b}$  y  $V_2$  y son expresados de manera tejido-específico. El receptor  $V_1$  activa a la fosfolipasa C produciendo aumento de  $IP_3$  intracelular y DAG (González y col, 1999). El receptor  $V_{1a}$  modula la vasoconstricción del músculo liso, gluconeogénesis hepática y agregación plaquetaria (Morel y col, 1992). El receptor  $V_{1b}$  en cambio modula la secreción de ACTH de la pituitaria anterior. Por otro lado, el receptor tipo  $V_2$  tiene efectos anti-diuréticos, estimula a la adenilato ciclasa y la protein kinasa A induciendo, consecuentemente, el aumento del AMPc intracelular (Saito y col, 1995; Lolait y col, 1992). Existen evidencias que la unión de vasopresina a su receptor  $V_1$  induce la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, mediante la activación de PKC (González y col, 1999). Además, la activación del receptor  $V_{1a}$  de AVP induce la sobre-expresión de los genes de respuesta temprana *c-fos* y *Egr-1*; así como también de la ciclina D1 (C. González, comunicación personal).



Recientemente se han encontrado evidencias que los queratinocitos humanos expresan receptores  $V_1$  de vasopresina. Mediante técnicas de inmunohistoquímica y autorradiografía se ha localizado este receptor en la epidermis *in situ*, tanto en queratinocitos basales como suprabasales, y en queratinocitos en cultivo (Vidal y col, 2003). En los cultivos de queratinocitos humanos estimulados con AVP este péptido estimula la fosforilación de MAPK de manera rápida y transitoria (Vidal y col, 2003), lo cual podría estar relacionado con procesos de proliferación celular (Harada y col, 2001). Sin embargo, no son conocidos los factores transcripcionales desencadenados por la estimulación del receptor  $V_1$  en los queratinocitos humanos (Fig. 1).

### **2.3 Antígeno de diferenciación leucocitaria CD40**

El antígeno de diferenciación leucocitaria CD40 es una glicoproteína de 50 KDa, perteneciente a la familia de los receptores del factor de crecimiento neuronal y TNF (Noelle y col, 1992). Se expresa tanto en células B como en monocitos, células dendríticas y linfocitos T (Caux y col, 1994). Su ligando, gp 39 o CD40L, corresponde a una glicoproteína de 39 KDa expresada en linfocitos T activados.

La unión de CD40 a su ligando es esencial en la activación, proliferación y diferenciación de las células B a células productoras de inmunoglobulinas (van Kooten y Banchereau, 1997). CD40 no solo es expresado en células de origen hematopoyético, sino también en células epiteliales. Es así como la epidermis *in situ* y los queratinocitos en cultivo expresan CD40 (Péguet-Navarro y col, 1997). La estimulación de estos últimos con fibroblastos transfectados con CD40L inhibe su capacidad proliferativa e induce la producción de (pro)filagrina, un

marcador de la diferenciación terminal de las células epidérmicas, (Péguet-Navarro y col, 1997; Concha y col, 2003).

La unión CD40/CD40L induce en linfocitos B la fosforilación de proteínas y la activación de diferentes proteínas quinasas (Uckun y col, 1991) así como la activación de p38, c-jun y el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; Grammer y col, 1998). En otros tipos celulares, incluidos los queratinocitos, las señales de transducción generadas por CD40 son poco conocidas.

## **2.4 Factores reguladores de la transcripción**

### **2.4.1 Ciclinas**

En los sistemas eucarióticos el ciclo celular se divide en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M. La fase G<sub>1</sub> corresponde al intervalo entre la mitosis y la fase S. Este periodo se caracteriza por la expresión de genes y la síntesis de proteínas que permiten a la célula crecer y producir las proteínas necesarias para la síntesis de su DNA. G<sub>1</sub> tiene el periodo de duración más variable del ciclo celular el cual influye de manera importante en la tasa de proliferación celular. A continuación la célula entra en la fase S o de síntesis, período durante el cual replica su DNA y sintetiza histonas, proteínas necesarias para la formación de cromatina. En la fase G<sub>2</sub>, que antecede a la fase M, la célula nuevamente crece y se sintetizan proteínas como tubulina, necesarias para producir la división física de la célula. Constituye, además un punto de control adicional del ciclo. En la fase M o de mitosis la célula se divide. Después que la célula ha completado la fase M, existen tres caminos posibles: i) el escape temporal del ciclo celular donde la célula entra en reposo (G<sub>0</sub>); ii) la re-entrada en el ciclo celular, iniciando nuevamente la fase

G<sub>1</sub>; y iii) la salida del ciclo e inicio de la diferenciación celular (Haake y col, 2001), como ocurre en la epidermis, donde la célula sufre una serie de transformaciones metabólicas que la van diferenciando hasta morir al alcanzar la capa córnea. Cada una de estas fases es regulada por la acción coordinada de complejos moleculares de proteínas quinasas que poseen subunidades reguladoras llamadas *ciclinas* y subunidades catalíticas denominadas *quinasas dependientes de ciclinas* o cdk (Draetta, 1994) (Fig. 2).

La actividad de las ciclinas es modulada por mitógenos, factores de crecimiento y factores transcripcionales como NF- $\kappa$ B. Los miembros de la familia de las ciclinas se dividen en dos clases principales: las ciclinas G<sub>1</sub> y las ciclinas G<sub>2</sub>. Entre las ciclinas G<sub>1</sub> se encuentran las ciclinas D (D1, D2, D3) y las ciclinas E. Estas, dependiendo de su nivel de transcripción, limitan la progresión de la fase G<sub>1</sub> a la fase S (Sherr, 1995). Las ciclinas G<sub>2</sub> o mitóticas, incluyen a las ciclinas A y B, que están involucradas en el control de la fase S y de la transición entre la fase G<sub>2</sub> y la fase M del ciclo celular (Viallard y col, 2001).

Por otro lado, existen las cdk4, cdk6, cdk2 y cdc2 cuya actividad es expresada durante el ciclo celular en forma diferenciada en respuesta a cambios en la concentración y unión de las ciclinas, a fosforilaciones de proteínas en residuos de treonina/serina y tirosina y a la unión de inhibidores de cdk como p21, p27, p57 y la familia del factor INK4 (Diep y col, 2001).

En la epidermis, las células madres se localizan en el estrato basal y la actividad mitótica está confinada a éste y al estrato parabasal. La cantidad de células en división aumenta como respuesta a los agentes que estimulan la división de las células. Este hecho se observa en la hiperplasia reparativa secundaria a heridas, en respuesta a agentes promotores de tumores como ésteres de forbol (TPA) y cuando los mecanismos que normalmente regulan la velocidad de la proliferación celular están alterados (Haake y Holbrook, 2001). En resumen, la actividad de las

ciclinas es un buen indicador del nivel de actividad mitótica de las células, por lo que su detección es considerada de ayuda en los estudios de proliferación celular (Diep y col, 2001).

#### **2.4.2 NF- $\kappa$ B**

Un amplio rango de señales como citoquinas, mitógenos, productos virales, radiaciones ultravioleta, etc, inducen la expresión de genes de respuesta temprana mediante la activación de factores transcripcionales. Uno de estos factores corresponde a NF- $\kappa$ B, una proteína reguladora de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, en la respuesta inmune y en la división celular, cuya activación provoca su translocación desde el citoplasma al núcleo (Cowling y col, 2002). El conocimiento actual respecto a NF- $\kappa$ B muestra que en realidad corresponde una familia de proteínas cuyos miembros son NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), Rel A (p65), Rel B y c-Rel. Todas estas proteínas tienen una alta homología en el dominio Rel que es responsable de su dimerización, de la unión al DNA y de la interacción con I $\kappa$ B, un inhibidor intracelular de NF- $\kappa$ B (Chen y col, 2001). La proteína NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma como un dímero inactivo, unido a la proteína I $\kappa$ B (Liou y col, 1993). La activación del dímero es inducida por TNF- $\alpha$ , IL-1, activadores de la PKC, agentes oxidantes, los virus EBV y CMV y radiaciones UV. La activación de los dímeros citoplasmáticos de NF- $\kappa$ B requiere de la degradación del complejo asociado I $\kappa$ B mediante la fosforilación de residuos serina-específicos. La degradación desencadena la translocación de NF- $\kappa$ B desde el citoplasma al núcleo, donde su interacción con el DNA induce la expresión de los genes de las proteínas de la fase aguda, moléculas de adhesión intercelular, reguladores de la apoptosis y reguladores de división celular (Chen y col, 2001).

### 2.4.3 Egr-1

El factor de transcripción Egr-1 (early growth response-1; también conocido como NGFI-A, Krox 24, zif 268, TIS 8) es el producto de uno de los miembros de una compleja familia de genes involucrada en la expresión de proteínas que regulan el crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Larsen y col, 1994). Más específicamente, Egr-1 pertenece al grupo de genes conocidos como *genes de respuesta temprana*, cuya expresión es inducida rápidamente por factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores (Thiel y col, 2002). La expresión de Egr-1 es inducida durante la estimulación mitogénica de una variedad de tipos celulares, que incluyen a los fibroblastos, células B y células epiteliales. El tratamiento tópico con TPA induce la sobreexpresión del mRNA de Egr-1 tanto en la epidermis como en la dermis de los ratones tratados (Riggs y col, 2000).

### 2.4.4 c-fos

El gen *fos* fue identificado en un principio como el oncogen *v-fos*, presente en el genoma del virus del sarcoma aviar 17 y del virus FBR, y que induce el osteosarcoma del ratón. La familia del gen *fos* está constituida por *c-fos*, *fosB*, *Fra-1* y *Fra-2* (Tulchinsky, 2000).

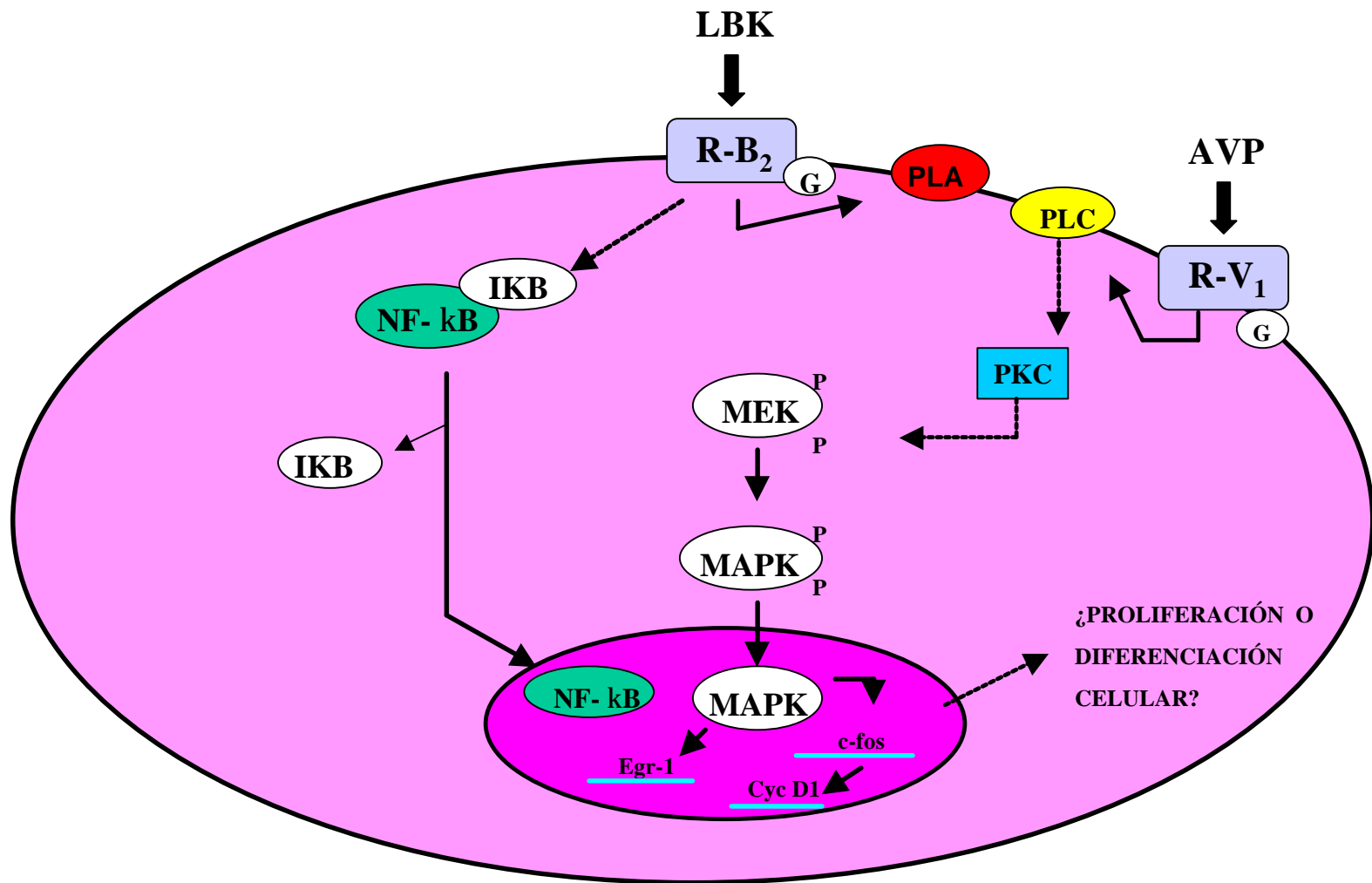
La expresión del alelo normal del oncogen *c-fos* es inducida por una variedad de estímulos, entre ellos los sueros animales, EGF, PDGF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e IL-1. El producto génico está implicado en el control de la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares (Angel y Szabowski, 2002). Las proteínas *fos* y *jun* presentan claras homologías estructurales en el dominio de unión al DNA y en el dominio encargado de la actividad transcripcional. Es

interesante señalar que el factor de transcripción AP-1 (Activating Protein-1) corresponde a un homodímero formado por la asociación de dos miembros de la familia *c-jun* o a un heterodímero, formado por la asociación de un miembro de la familia *jun* y un miembro de la familia *fos*. AP-1 se une a secuencias específicas de DNA regulando la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular. La actividad biológica de las proteínas *fos* está regulada por fosforilación. Esta es activada por un grupo de kinasas cuya activación previa es mediada por factores de crecimiento como ERKs (El-Dahr y col, 1998). Las alteraciones que presentan las formas oncogénicas de estas proteínas impiden su regulación y aumentan su expresión, dando como resultado una actividad transcripcional permanente.

En conclusión, no obstante la abundante información acumulada en la literatura acerca de diversos factores que intervienen en la regulación de la proliferación y diferenciación de los queratinocitos de la epidermis humana, este problema no ha sido resuelto. En este sentido, se han identificado una serie de moléculas cuya función en la epidermis es muy poco conocida. Algunas de ellas, extensamente estudiadas por su función pro-inflamatorias -como vasopresina y cininas- podrían ejercer un efecto regulador de la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.

## 2.5 Objetivos

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue estudiar en queratinocitos humanos en cultivo la expresión de factores reguladores de la transcripción activados por la unión de receptores  $V_1$  de vasopresina y B2 de cininas a sus ligandos arginina vasopresina (AVP) y lisina-bradicinina (LBK), respectivamente. En particular se investigó mediante electroforesis de proteínas en SDS-PAGE y Western-blotting la expresión de las ciclinas A y D1; los factores de respuesta temprana c-fos y Egr-1; la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B; y la expresión de (pro)filagrina, un marcador de diferenciación terminal de los queratinocitos. Los resultados obtenidos demuestran que LBK es capaz de inducir la expresión de genes como c-fos y Egr-1, ciclina D1, la translocación nuclear del factor transcripcional NF- $\kappa$ B. En cambio, AVP sólo induce la expresión de los factores c-fos, Egr-1 y ciclina D1. La comparación de LBK y AVP con el potente efecto de los anticuerpos anti-CD40 sobre la inducción de (pro)filagrina, sugiere que LBK posee una moderada capacidad de inducción de la diferenciación del queratinocito pero no así AVP.



**Fig. 1:** Representación esquemática de probables vías implicadas en los queratinocitos humanos luego de la activación del receptor B<sub>2</sub> de cininas y V<sub>1</sub> de vasopresina



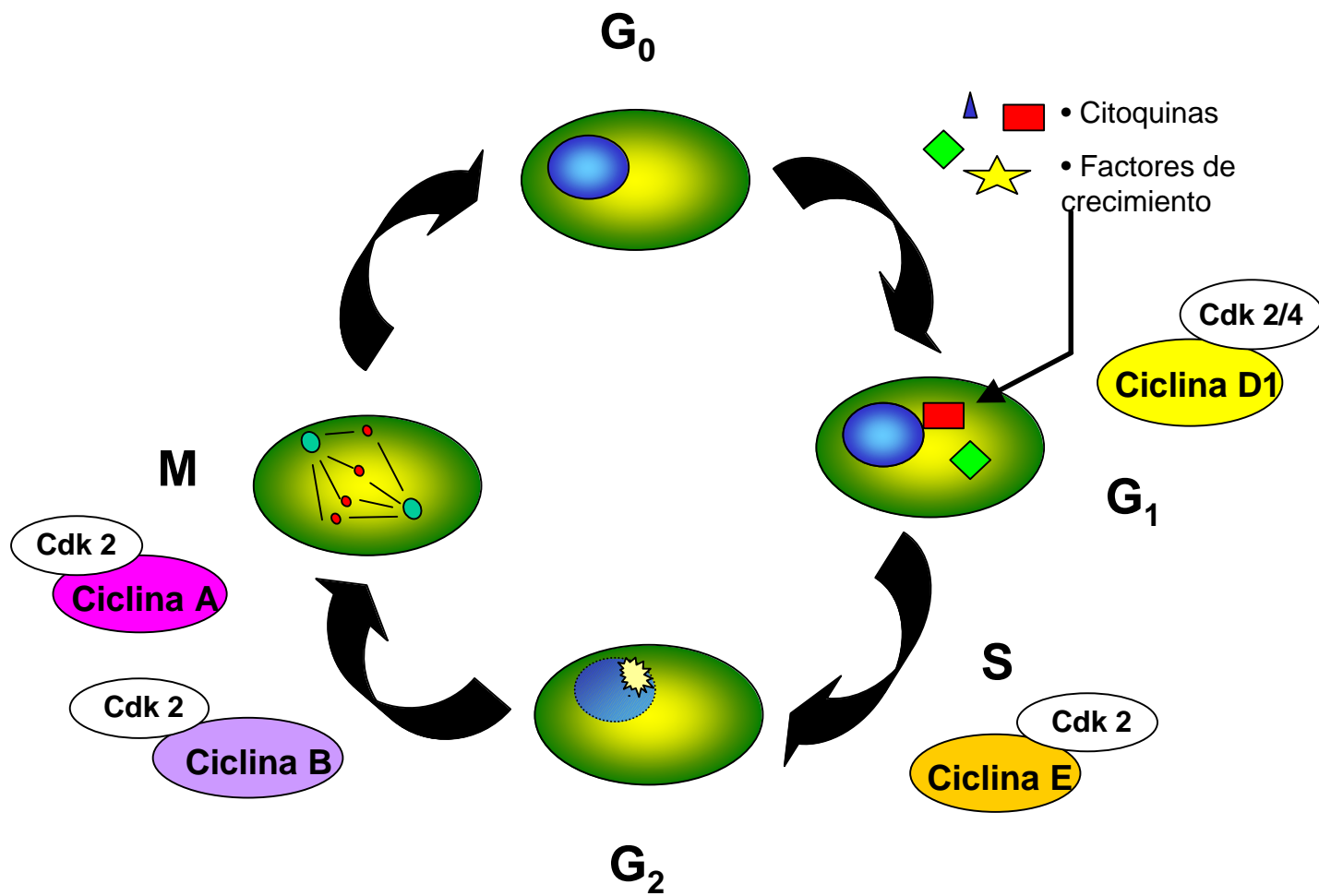


Fig. 2 : Representación esquemática de la interacción entre ciclinas y cdk's en la regulación del ciclo celular

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Equipos

Cámara de flujo laminar Factommet; baño termorregulado VWR Scientific Products Model 1202; centrífuga de aceleración programable Sigma 4k-10; microcentrífuga Biofuge 15 Heraeus; estufa de cultivo Memmert; microscopio invertido Nikon; microscopio óptico Zeiss; sonicador Cole-Parmer Instruments Co 4710; espectrofotómetro Shimadzu OPI-2; balanza analítica electrónica Precisa 120 A; fuente de poder Apparatus Ec-1000; cámara de electroforesis y cámara de transferencia Bio JSP Ltda; agitador circular Heidolph; cámaras de exposición para autoradiografía Sigma; microscopio de fluorescencia Zeiss (con cámara fotográfica MC80).

#### 3.2 Medios de cultivos

Para el cultivo primario de queratinocitos se utilizó el medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* 1.8 mM Ca<sup>+2</sup> (DMEM, Gibco BRL, Life Technologies) junto a *Ham's F-12* (Gibco BRL, Life Technologies) en una proporción de 3:1, suplementado con 10% suero fetal de bovino (SFB, Hyclone, Logan, Utah, USA), hidrocortisona 0,4 µg/ml (Sigma, Chemical Co.), toxina del cólera 10<sup>-10</sup> M (Sigma, Chemical Co.), insulina 5 µg/ml (Sigma, Chemical Co.), factor de crecimiento epidérmico 10µg/ml (Sigma, Chemical Co.), penicilina-estreptomicina al 1% (10000 UI/ml de penicilina G sodica y 10000 µg/ml de sulfato de estreptomicina; Gibco BRL, Life Technologies) y fungizone® al 1% (250 µg/ml de anfotericina B y 205 µg/ml de deoxicolato de sodio; Gibco BRL, Life Technologies).

Para la activación celular se utilizó el medio de cultivo *Defined Keratinocyte Serum free Medium* con  $<0,1$  mM de  $\text{Ca}^{+2}$  (DK-SFM; Gibco BRL, Life Technologies) suplementado con antibióticos y factores de crecimiento que incluían insulina, factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento de fibroblastos (estos últimos proporcionados por el proveedor como un kit).

### 3.3 Anticuerpos y péptidos

Para la estimulación de los queratinocitos se emplearon los péptidos lisina-bradicinina (LBK) 100 nM (Sigma, Chemical Co.), arginina-vasopresina (AVP) 100 nM (Sigma, Chemical Co.).

Para la identificación de factores nucleares, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-ciclina A (Ab-3), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Oncogene<sup>TM</sup>, USA) y los anticuerpos policlonales anti-ciclina D1, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-c-fos, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-Egr-1, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Santa Cruz Biotechnology, USA) y anti- NF-kB p65, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Para el estudio de la expresión de (pro)filagrina, además de los péptidos mencionados, se utilizó como control positivo de la inducción de la diferenciación celular el anticuerpo monoclonal anti-CD40 M89 (Immunotech Marseille, France). Como control negativo del efecto de M89 se empleó el anticuerpo anti-IgG<sub>1</sub> de ratón de igual isotipo pero de especificidad no relacionada (DAKO, USA). La (pro)filagrina fue detectada mediante el anticuerpo anti-(pro)filagrina (Biomedical Technologies Inc, Stoughton MA, USA) a una dilución de 1:1000.

### 3.4 Aislamiento de células epidérmicas y cultivo de queratinocitos humanos

Las células epidérmicas humanas fueron obtenidas a partir de biopsias de piel de pacientes sometidos a cirugía reparadora. La piel fue desgrasada, extendida sobre una plataforma de goma cubierta con gasa y mediante el uso de un querátomo se obtuvieron láminas de piel de aproximadamente 1mm de espesor. De acuerdo al método de Rheinwald y Green (1975), las láminas se incubaron en tripsina 0,05% en medio Hank's sin  $\text{Ca}^{+2}$  ni  $\text{Mg}^{+2}$  (HBSS) durante 1h a  $37^{\circ}\text{C}$  y luego, utilizando pinzas de disección, la epidermis fue separada de la dermis, disgregada con tijeras y pipeteada repetidas veces hasta obtener una suspensión celular homogénea. Esta suspensión se filtró en una gasa estéril y se lavó en medio HBSS suplementado con 10% SFB. El recuento celular y la viabilidad fueron estimadas por exclusión con azul tripano 0,5% (Sigma, Chemical Co.)

Las células obtenidas fueron cultivadas en igual proporción con fibroblastos 3T3 previamente irradiados con 6000 rads en un irradiador de Cobalto 60. El cultivo se realizó en botellas de  $75\text{ cm}^2$  en medio DMEM-F12 suplementado, a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera húmeda con 5%  $\text{CO}_2$  hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Luego, los queratinocitos fueron desprendidos de las botellas con tripsina 0,25%-EDTA a  $37^{\circ}\text{C}$  y las células recuperadas fueron lavadas en solución HBSS-10% SFB y resuspendidas en medio de congelación *cell culture freezing medium* DMSO® (Gibco BRL, Life Technologies) a una concentración de  $6 \times 10^6$  células/ml y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un contenedor de células (Freezing Container, Nalgene, Sigma Chemical Co.). Luego de 24 h las células fueron guardadas en nitrógeno líquido hasta su utilización.

### 3.5 Activación de queratinocitos humanos en cultivo con LBK y AVP

Los queratinocitos una vez despertados, se sembraron en placas petri de 60 mm de diámetro a una razón de  $1 \times 10^6$  células/placa y fueron cultivados a subconfluencia en medio DK-SFM suplementado. Este medio libre de suero y que tiene menos de  $0,1 \text{ mM Ca}^{+2}$  permite que las células crezcan en monocapa ya que inhibe su estratificación. Los cultivos fueron mantenidos a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de  $5\% \text{ CO}_2$  realizándose cambios de medio cada 3 días. Antes de realizar el ensayo de activación, las células se mantuvieron 24 h en medio base (DK-SFM sin factores de crecimiento). Posteriormente se procedió a la estimulación de los queratinocitos durante 1, 3, 6, 12, 24 y 48 h a  $37^\circ\text{C}$  con LBK  $100 \text{ nM}$  o AVP  $100 \text{ nM}$ . La reacción se detuvo colocando la placa en hielo, retirando el medio base y lavando con 1ml de solución de inhibidores (PMSF  $1 \text{ mM}$ , Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina  $1 \text{ mg/mL}$  cada una,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$   $1 \text{ mM}$  Sigma, Chemical Co). Luego, raspando con una espátula de teflón se recolectaron las células en  $100 \mu\text{L}$  de tampón RIPA con inhibidores (Tris-HCL  $50 \text{ mM}$ , pH 7,4, Nonidet P-40  $1\%$ , EDTA  $1 \text{ mM}$ , EGTA  $1 \text{ mM}$ , NaCl  $150 \text{ mM}$ , Na-deoxicolato  $10\%$ , PMSF  $1 \text{ mM}$ , Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina  $1 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$   $1 \text{ mM}$ ). Las células se transfirieron a tubos de microcentrífuga y fueron sonicadas por 20 a 30 seg. La concentración de proteínas totales del extracto celular fue determinada mediante el método de Bradford. Las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de  $595 \text{ nm}$ , y luego interpoladas en una curva de calibración estandarizada. Las muestras fueron mantenidas a  $-20^\circ\text{C}$  en tampón de muestra 2X (Tris  $0,06 \text{ M}$ ; glicerol  $10\% \text{ p/v}$ ; 2-mercaptoetanol  $0,5\% \text{ v/v}$  y SDS  $4,6\% \text{ p/v}$ ), hasta su utilización. Como control de la especificidad de la reacción, se utilizaron células no estimuladas y procesadas de la misma manera.

### 3.6 Obtención de extractos proteicos citosólicos y nucleares de células epidérmicas humanas

Los queratinocitos fueron despertados y cultivados bajo las mismas condiciones descritas en el punto anterior. Luego de 24 h en medio base los queratinocitos fueron estimulados por 1 hr a 37°C con una concentración de 100 nM de LBK o AVP en el mismo medio de cultivo. Terminado el tiempo de estimulación, las placas se colocaron sobre hielo y las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, agregándoseles luego una solución que contenía PBS-EDTA 5 mM. Posteriormente, las células fueron raspadas con una espátula de teflón, recolectadas en tubos Eppendorf y centrifugadas a 6000 rpm por dos minutos a 4°C. El sedimento fue resuspendido en 300 µL de tampón A (Hepes 10 mM pH 7.9, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM, FNa 5 mM, Leupeptina 1 µg/ ml, Aprotinina 1 µg/ ml y PMSF 1 mM) y dejado en hielo por 20 min. Luego, se le agregaron 25 µL de NONIDET-P40 al 10%, se agitó violentamente en un vortex y se dejó en hielo por otros 15 min. Terminado este tiempo, se realizó una nueva centrifugación a 13000 rpm por dos minutos a 4°C.

El sobrenadante obtenido de esta última centrifugación correspondió al extracto citosólico, el cual se recolectó en un tubo Eppendorf. Al sedimento se le agregó 200 µL de tampón A y sin resuspender fue mantenido en hielo por 15 min. Posteriormente se le aplicó un spin-down por 30 seg y se eliminó todo el sobrenadante. A continuación, se procedió a lisar los núcleos por 1 h en hielo con 50 µL de tampón C (Hepes 20 mM pH 7.9, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 0.4 M NaCl, DTT 1 mM, FNa 5 mM, Leupeptina 1 µg/ ml, Aprotinina 1 µg/ ml y PMSF 1 mM) con agitaciones regulares en el vortex. El extracto fue sonificado y centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación correspondió al extracto nuclear el cual se recolectó cuidadosamente en un tubo Eppendorf.

Una vez obtenidos ambos extractos, se realizó determinación de proteínas por el método de Bradford y las proteínas de los extractos fueron precipitadas con TCA al 20% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, luego de eliminar el TCA se realizó un lavado con éter a 13000 rpm por 15 min y las muestras fueron guardadas a -80°C en tampón de muestra 2X.

### **3.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia y quimioluminiscencia**

#### **3.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Las electroforesis se llevaron a cabo según el método de Laemmli (1970) con algunas modificaciones. Se utilizaron geles de 12,5% acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio y  $\beta$ -mercaptoetanol (SDS-PAGE) preparados de la siguiente manera:

*Gel Separador (12,5%)*: tampón inferior (Tris-HCL 1,5 M pH 8.3; SDS 0,4%) 3,6 mL; solución de acrilamida al 30% (acrilamida 29,2% y bisacrilamida 0,8%, Gibco BRL, life Technologies) 6,12 mL; agua destilada, 4,8 mL; persulfato de amonio al 10% (Sigma Chemical Co.) 37,5  $\mu$ L y Temed 30  $\mu$ L (Gibco BRL; Life Technologies).

*Gel Espaciador*: tampón superior (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4%) 0,94 mL; solución de acrilamida al 30% 0,6 mL; agua destilada 2,22 mL; persulfato de amonio al 10% 20  $\mu$ L y Temed 10  $\mu$ L. Los geles fueron montados en placas de vidrio con espaciadores de teflón de 1,5 mm de espesor. Las muestras junto a los estándares de pesos moleculares preteñidos 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5, 6.5 kDa (Winkler); o en ciertos casos de 118, 85, 46, 33, 26, 19.5 kDa (W&Z) fueron hervidas por tres minutos y enfriadas a temperatura ambiente. El gel fue sembrado con 50

$\mu\text{g}$  de proteína por surco y la corrida electroforética se realizó a 100 V durante 3 h en tampón de corrida (Tris 0,02 M, glicina 0,05 M y SDS 0,1%).

### **3.7.2 Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa**

La transferencia se realizó según el método de Towbin y col. (1979). Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, USA, tamaño de poro 0,22  $\mu\text{m}$ ) utilizando una corriente constante de 50 mA por 15 h en tampón de transferencia que contenía Tris 0,02 M, glicina 0,15 M y metanol al 20%. Posteriormente la membrana fue lavada en una solución de TTBS (TBS; Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,5 M, Tween-20 al 0,1%) para eliminar restos de tampón de transferencia y realizar la inmunotinción por el método de quimioluminiscencia.

### **3.7.3 Quimioluminiscencia**

La membrana fue bloqueada durante 90 min con tampón de bloqueo (TBS 1X, Tween-20 al 0,1%, 5% p/v de leche descremada en polvo) a temperatura ambiente, realizando cambios de tampón cada 30 min. A continuación, se realizaron varios lavados con TTBS y se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo respectivo diluido en tampón de dilución TBS 1X, Tween-20 al 0,1% y BSA 5%. Posteriormente, la membrana fue lavada varias veces con abundante TTBS durante 120 min (3 x 5 min, 1 x 15 min, 3 x 30 min), e incubada por 90 min con el segundo anticuerpo respectivo (anti IgG de ratón o anti IgG de conejo según el origen del primer anticuerpo) conjugado a peroxidasa (Pierce, USA) diluido 1: 50.000 en el tampón de



bloqueo. Luego de rigurosos lavados con TTBS durante 120 min se procedió a incubar por 20 min con Super Signal®West Dura Extended. Finalmente, las membranas fueron expuestas en cámara oscura a placas Kodak Bio Max para así identificar las bandas inmunoreactivas específicas.

### **3.8 Visualización del factor de transcripción NF-κB p65 en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK y AVP**

Los queratinocitos fueron cultivados en cámaras de cultivo tipo portaobjeto (Lab-Tek® Chamber Slide™ System) en medio DK-SFM hasta subconfluencia. Luego, estos fueron estimulados por diferentes tiempos 0, 5, 15, 30, 60 y 120 minutos con 100 nM de LBK o AVP. Posteriormente las células fueron fijadas con *p*-formaldehído al 4% en PBS, lavadas con PBS y tratadas con metanol absoluto por 6 min a -20°C. A continuación, las células fueron incubadas por 60 min con el anticuerpo anti-NF-κB p65, seguida de la incubación por 30 min con F(ab')<sub>2</sub> IgG anti-conejo marcado con fluoresceína (DAKO, USA). Los preparados finalmente fueron montados en *p*-fenilmoviol (Moviol 4-38 con 0,5% de *p*-fenilendiamina).

### **3.9 Identificación de (pro)filagrina en queratinocitos humanos estimulados con AVP y LBK**

Los queratinocitos fueron sembrados y cultivados bajo las condiciones descritas en el punto 3.5 hasta que alcanzaron un 60-70% de confluencia. Posteriormente fueron estimulados por dos días con 100 nM de AVP y LBK. Como control positivo las células fueron incubadas con 100 nM de M89 y con IgG<sub>1</sub>. Finalizado el tiempo de estimulación, las células fueron

recolectadas en tampón de lisis TRIS-UREA pH 7.4 con inhibidores (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM  $\beta$ - mercaptoetanol, 9 M urea, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 $\mu\text{g/ml}$  Aprotinina, 1 $\mu\text{g/ml}$  Pepstatin y 1 $\mu\text{g/ml}$  Leupeptina). Una vez obtenidos los extractos, éstos fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6 % (tampón inferior (Tris-HCL 1,5 M pH 8.3; SDS 0,4%) 3,6 mL; solución de acrilamida al 30% (acrilamida 29,2% y bisacrilamida 0,8%, Gibco BRL, life Technologies) 3,0 mL; agua destilada, 7,8 mL; persulfato de amonio al 10% (Sigma Chemical Co.) 37,5  $\mu\text{L}$  y Temed 30  $\mu\text{L}$  (Gibco BRL; Life Technologies) y electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa. La expresión de (pro)filagrina fue detectada mediante anticuerpos anti-(pro)filagrina y el método de quimioluminiscencia, como se describe en el punto 3.7.3.

#### **4.0 Análisis de imagen y gráficos**

Con el objeto de cuantificar la inmunoreactividad de las bandas más representativas y de las cuales nos interesaba conocer su variación, se utilizaron los programas que a continuación se mencionan.

Para el análisis densitométrico de las bandas reveladas mediante ECL se utilizó el programa UN-SCAN-IT gel Automated Digitizing System versión 4.1 para Windows. Para construir los diferentes gráficos se utilizaron los datos obtenidos del análisis de imagen y se llevaron al programa SIGMAPLOT 3.0, donde se calculó el promedio y el error estándar de tres mediciones, correspondientes a la intensidad en píxeles totales de las zonas más representativas de la banda. De esta manera se graficaron las intensidades en píxeles totales versus la condición experimental correspondiente.

## 4. RESULTADOS

Para la obtención de los resultados, los queratinocitos fueron estimulados con arginina-vasopresina (AVP) o lisina-bradicinina (LBK) en las dosis y los tiempos que se indican en los resultados respectivos. Posteriormente se obtuvieron extractos proteicos que fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 % y electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa, como se indica en Material y Métodos (punto 3.5).

### **4.1 AVP induce en queratinocitos la expresión de los genes de respuesta temprana c-fos y Egr-1**

Para estudiar el efecto de AVP sobre la expresión de genes de respuesta temprana en queratinocitos humanos, se estimularon cultivos subconfluentes de queratinocitos con 100 nM de AVP por tiempos de 1, 3, 6, 12, 24 y 48 h. El estudio de los extractos proteicos con la técnica de Western-blotting y anticuerpos anti-c-fos y anti-Egr-1, revelados mediante quimioluminiscencia, permitió apreciar un doblete polipeptídico de una masa molecular de aproximadamente 62 kDa, correspondiente a la proteína c-fos. Su expresión alcanzó la máxima intensidad a las 6 h de estimulación, decreciendo luego progresivamente ( Fig. 3).

La estimulación con AVP también indujo la expresión de varios polipéptidos de masa molecular de aproximadamente 80 kDa, inmunoreactivos al anticuerpo anti Egr-1. Este efecto se observó a las 6 h de estimulación, alcanzando su máxima intensidad a las 12 h (Fig. 4).

## **4.2 AVP induce en queratinocitos en cultivo moderada expresión de ciclina D1 y no de ciclina A**

Para estudiar la importancia de AVP sobre la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en los queratinocitos humanos, cultivos subconfluentes de éstos fueron estimulados con 100 nM de AVP por diferentes tiempos. En la Fig. 5 se aprecia la expresión de una banda inmunoreactiva para ciclina D1 de masa molecular aproximada de 36 kDa. El efecto máximo de inducción ocurrió entre las 12 y 24 h de estimulación. Respecto a la expresión de ciclina A, no se observaron diferencias significativas con respecto a los queratinocitos no estimulados (Fig. 6).

## **4.3 LBK induce expresión de c-fos y Egr-1 en queratinocitos humanos**

El efecto de LBK sobre la expresión de c-fos y Egr-1 en queratinocitos humanos fue analizado en cultivos subconfluentes estimulados con LBK 100 nM en los tiempos antes mencionados. Como muestra la Fig. 7, 1 h de tratamiento con LBK induce la expresión de un doblete polipeptídico de masa molecular de aproximadamente 62 kDa, inmunoreactivo a anticuerpos anti-c-fos. La expresión de este doblete se mantuvo por 3 horas, disminuyendo posteriormente. La activación de los queratinocitos con LBK también indujo la expresión de polipéptidos de masa molecular de 80 kDa, reactivos para anticuerpos anti-Egr-1. Esta alcanzó a las 6 h de estimulación su máxima expresión, decreciendo a niveles basales luego de 12 h (Fig. 8).

#### **4.4 LBK induce en queratinocitos en cultivo la expresión de ciclina D1 pero no de ciclina A**

Con el objeto de estudiar si la estimulación de LBK inducía la expresión de ciclinas, se estimularon cultivos de queratinocitos subconfluentes con 100 nM de LBK por distintos tiempos. En la Fig. 9 se observa que entre las 6 y 48 h de estimulación se produce un aumento en la expresión de varios polipéptidos de masa molecular alrededor de 36 kDa reactivos para ciclina D1. No obstante, llama la atención que luego de 24 h de estimulación se produce una disminución en la expresión de dichos polipéptidos, los que recuperan sus niveles a las 48 h. En relación a la expresión de ciclina A, no se observaron diferencias significativas con respecto a los queratinocitos no estimulados (Fig. 10).

#### **4.5 LBK, pero no AVP, induce la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en queratinocitos en cultivo**

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción cuya activación ha sido involucrada en procesos de proliferación y diferenciación de las células epidérmicas. Uno de los miembros más estudiados de la familia de NF- $\kappa$ B corresponde a la proteína p65 (Joyce y col, 2001). Para estudiar si AVP y LBK tienen o no la capacidad de inducir en el queratinocito la translocación de NF- $\kappa$ B desde el citoplasma al núcleo, cultivos subconfluentes de queratinocitos fueron estimulados con AVP o LBK 100 nM por tiempos de 5, 15, 30, 60 y 120 min. Posteriormente las células fueron incubadas sucesivamente con un anticuerpo de conejo anti-Rel A (p65) y F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG de conejo marcado con fluoresceína. Como controles se utilizaron células no estimuladas con los péptidos, que fueron reveladas mediante el mismo procedimiento de inmunofluorescencia. Como se

muestra en la Fig. 11, los queratinocitos estimulados con AVP revelaron predominantemente marca citoplasmática para la proteína p65, observándose solo moderada inmunoreactividad nuclear entre los 60 y 120 min de estimulación. Por el contrario, la estimulación con LBK indujo la temprana localización nuclear de la marca inmunofluorescente para p65. En efecto, ya a los 5 min de estimulación se observó marcaje nuclear, el cual alcanzó su máxima intensidad entre los 30 y 120 min.

Considerando éstos resultados, se obtuvieron extractos proteicos citosólicos y nucleares de queratinocitos estimulados por 1 h con AVP y LBK 100 nM. Con este objetivo, las células fueron recolectadas y sometidas a centrifugaciones controladas en tampón de fuerza iónica débil para lisar las células; luego en presencia de detergentes para liberar el contenido celular y separar el material celular en una fracción precipitable y otra soluble. La primera, correspondiente a la fracción nuclear; la segunda, a la citoplasmática. Finalmente, el extracto nuclear fue sometido a alta fuerza iónica con el objeto de lograr su disolución (Material y Métodos, punto 3.6). Extractos de proteínas de cada fracción fueron procesados para Western-blotting utilizando el anticuerpo anti-p65 y quimioluminiscencia. Los resultados demostraron que la estimulación con LBK por 60 min indujo en los queratinocitos un cambio neto en la expresión nuclear y citoplasmática de un polipéptido de masa molecular de aproximadamente 65 kDa (Fig 12) específico para p65. En efecto, el análisis densitométrico de las bandas polipeptídicas demostró que en las células estimuladas con LBK, el 63% del polipéptido se localizaba en la fracción nuclear, y el 37% en la fracción citoplasmática. En cambio, en las células no estimuladas, el 64% de la proteína fue de localización citoplasmática, y el 36% nuclear. En los queratinocitos estimulados con AVP no se encontraron evidencias mediante Western-blotting de translocación de la proteína p65 (Fig. 12). Es así como el análisis densitométrico de las bandas respectivas mostró una distribución similar a

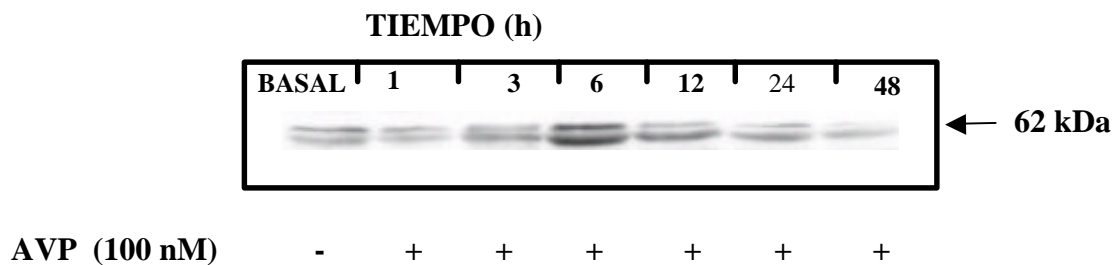
la observada en las células basales no estimuladas, con un 63,8% en el extracto citoplasmático, y un 36,2% en el extracto nuclear.

#### **4.6 LBK, pero no AVP, induce la expresión de (pro)filagrina en queratinocitos en cultivo**

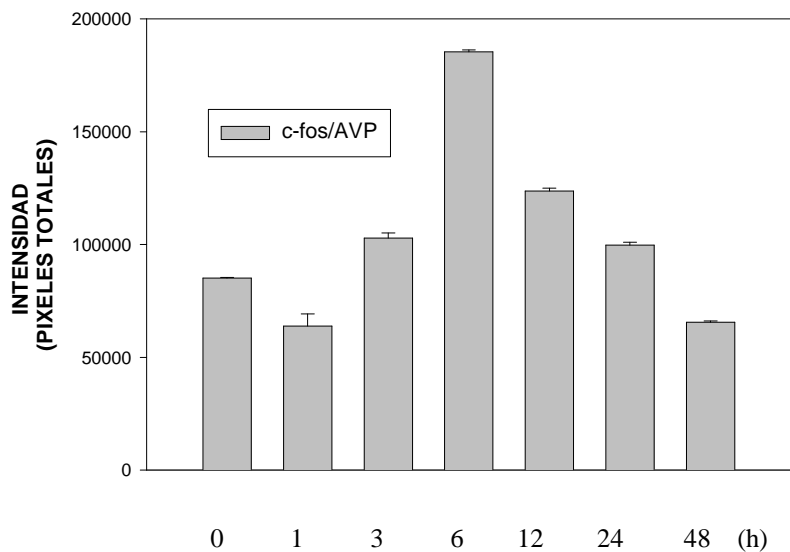
Con el objeto de evaluar la capacidad de AVP y LBK para inducir la diferenciación de los queratinocitos humanos, mediante Western-blotting se determinó la expresión de (pro)filagrina. Esta proteína se encuentra en gránulos citoplasmáticos de las células del estrato granuloso de la epidermis humana en la forma de (pro)proteína. Su forma madura la adquiere en el estrato espinoso, por lo que ha sido considerada un adecuado marcador de la diferenciación terminal del queratinocito (Fleckman y col, 1985). Con éste objetivo, cultivos subconfluentes de queratinocitos humanos fueron estimulados con AVP y LBK 100 nM por 48 h. Como control de la inducción de la expresión de (pro)filagrina, algunos cultivos fueron estimulados con el anticuerpo monoclonal 89 anti-CD40 (Immunotech, Francia). El análisis mediante Western-blotting demostró que LBK induce la producción de (pro)filagrina mientras que AVP es un pobre inductor de ésta. La inmunoreactividad observada corresponde a un patrón característico para esta proteína, cuya masa molecular aproximada es de 400 kDa, ya que el anticuerpo utilizado reacciona tanto con (pro)filagrina como con productos de la proteólisis de ésta. Estos resultados confirman además el potente efecto de CD40 sobre la diferenciación del queratinocito humano (Fig. 13).



a)

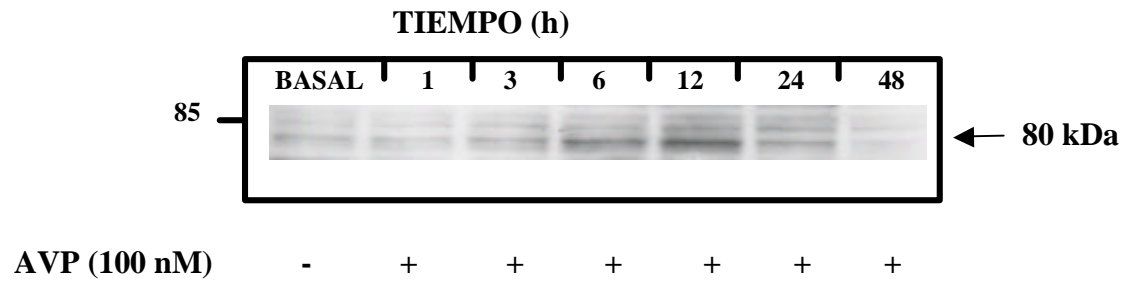


b)

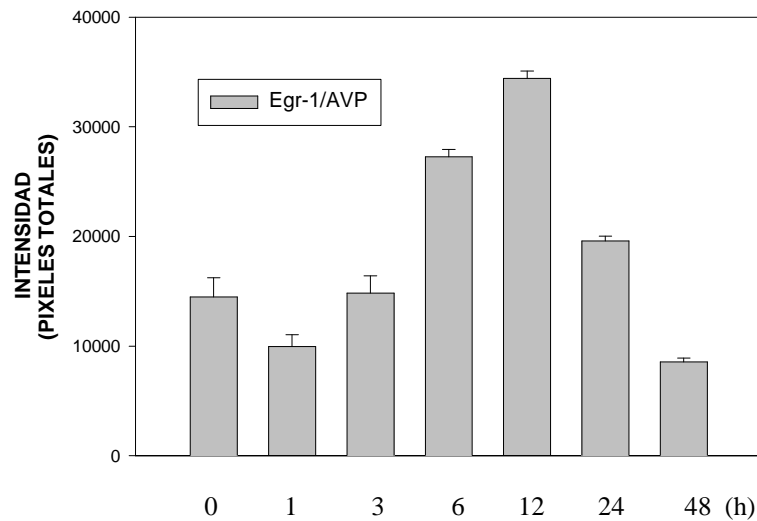


**Fig. 3 Expresión de c-fos en queratinocitos en cultivo estimulados con AVP** a) Western-blotting de extractos proteicos totales de queratinocitos estimulados con 100 nM de AVP a diferentes tiempos. Las bandas inmunoreactivas (flecha) corresponden a un doblete de masa molecular de aproximadamente 62 kDa. b) Análisis densitométrico de las bandas de interés. Los valores corresponden al promedio de intensidad en pixeles totales  $\pm$  error estándar (n = 3).

a)

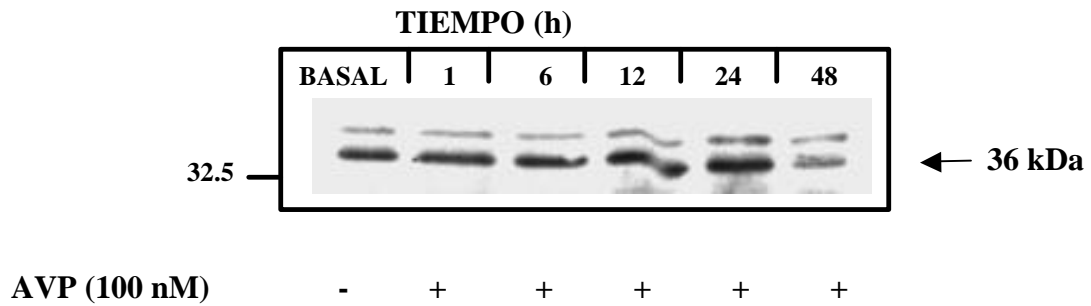


b)

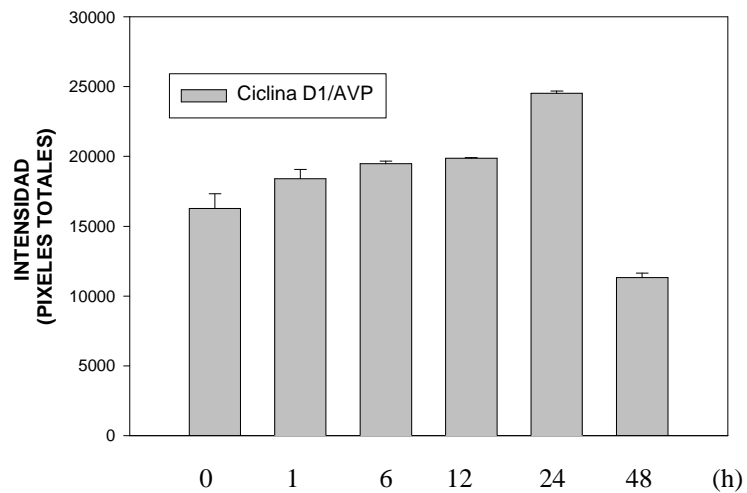


**Fig. 4 Expresión de Egr-1 en queratinocitos en cultivo estimulados con AVP** a) Western-blotting de extractos proteicos totales de queratinocitos estimulados con 100 nM de AVP a diferentes tiempos. Las bandas inmunoreactivas (flecha) corresponden a una banda de masa molecular de aproximadamente 80 kDa. b) Análisis densitométrico de las bandas de interés. Los valores corresponden al promedio de intensidad en pixeles totales  $\pm$  error estándar (n = 3).

a)

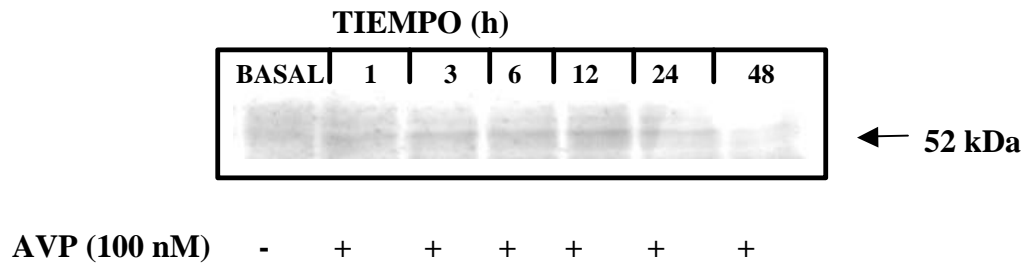


b)

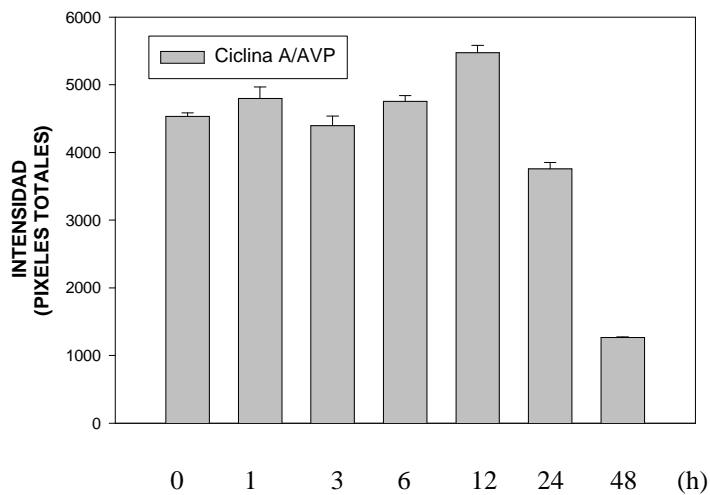


**Fig. 5 Expresión de ciclina D1 en queratinocitos en cultivo estimulados con AVP** a) Western-blotting de extractos proteicos totales de queratinocitos estimulados con 100 nM de AVP a diferentes tiempos. Las bandas inmunoreactivas (flecha) corresponden a un doblete de masa molecular de aproximadamente 36 kDa. b) Análisis densitométrico de las bandas de interés. Los valores corresponden al promedio de intensidad en pixeles totales  $\pm$  error estándar (n = 3).

a)

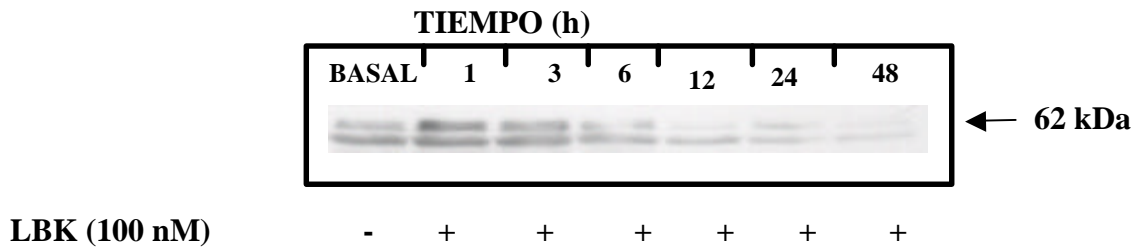


b)

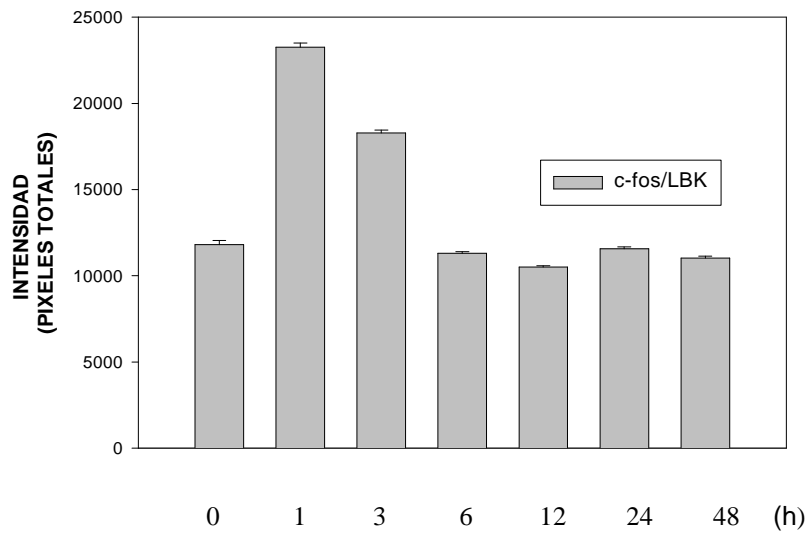


**Fig. 6 Expresión de ciclina A en queratinocitos en cultivo estimulados con AVP** a) Western-blotting de extractos proteicos totales de queratinocitos estimulados con 100 nM de AVP a diferentes tiempos. Las bandas inmunoreactivas (flecha) corresponden a un doblete de masa molecular de aproximadamente 52 kDa. b) Análisis densitométricos de las bandas de interés. Los valores corresponden al promedio de intensidad en pixeles totales  $\pm$  error estándar (n = 3).

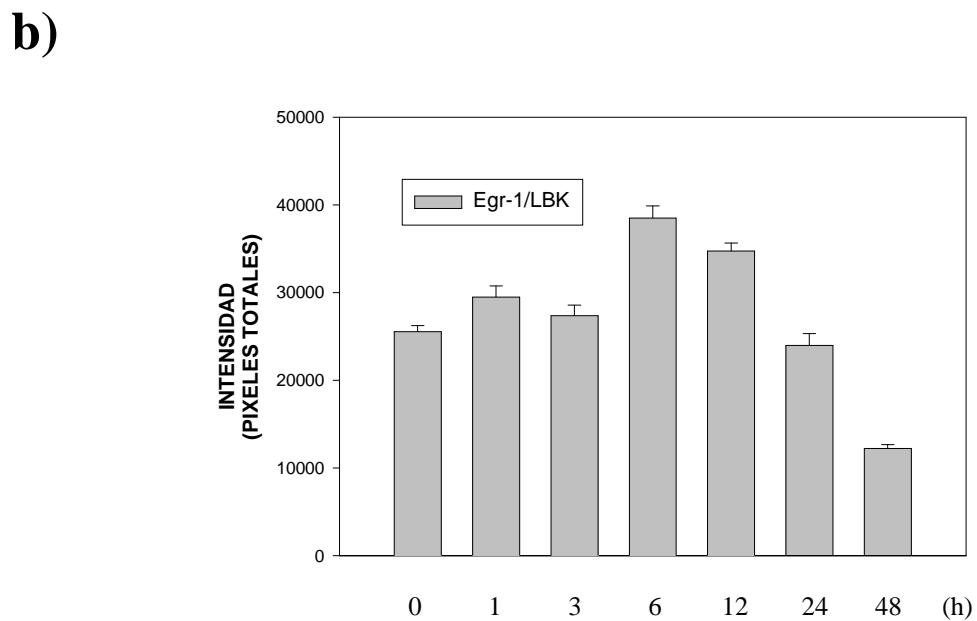
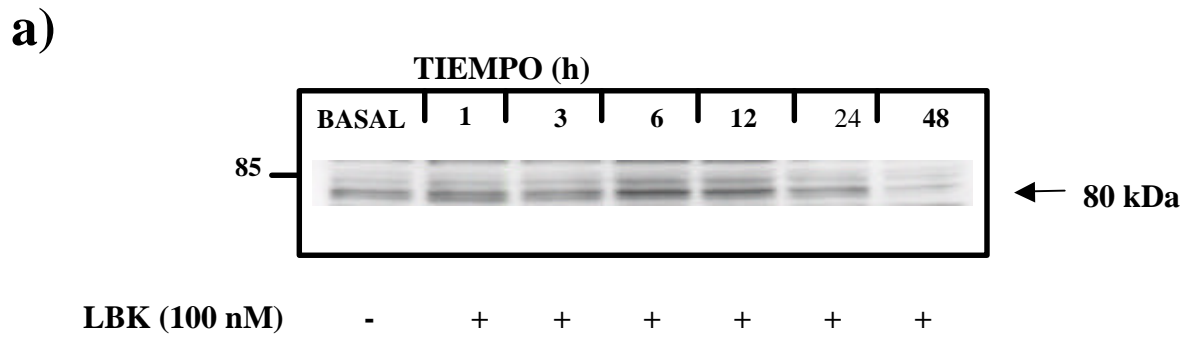
a)



b)

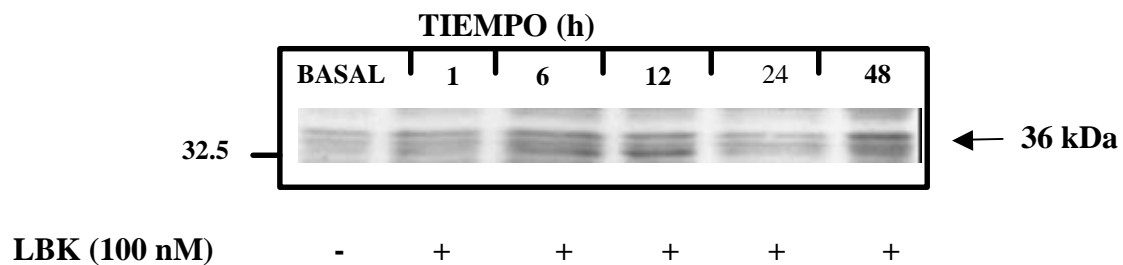


**Fig. 7 Expresión de c-fos en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK** a) Western-blotting de extractos proteicos totales de queratinocitos estimulados con 100nM de LBK a diferentes tiempos. Las bandas inmunoreactivas (flecha) corresponden a un doblete de masa molecular de aproximadamente 62 kDa. b) Análisis densitométrico de las bandas de interés. Los valores corresponden al promedio de intensidad en pixeles totales  $\pm$  error estándar (n = 3).

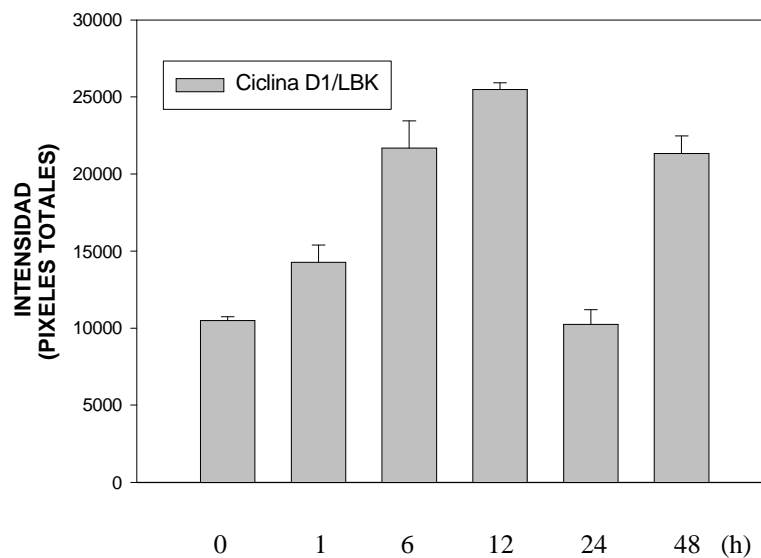


**Fig. 8 Expresión de Egr-1 en queratinocitos cultivo estimulados con LBK** a) Western-blotting de extractos proteicos totales de queratinocitos estimulados con 100 nM de LBK a diferentes tiempos. Las bandas inmunoreactivas (flecha) corresponden a una banda de masa molecular de aproximadamente 80 kDa. b) Análisis densitométrico de las bandas de interés. Los valores corresponden al promedio de intensidad en pixeles totales  $\pm$  error estándar (n = 3).

a)



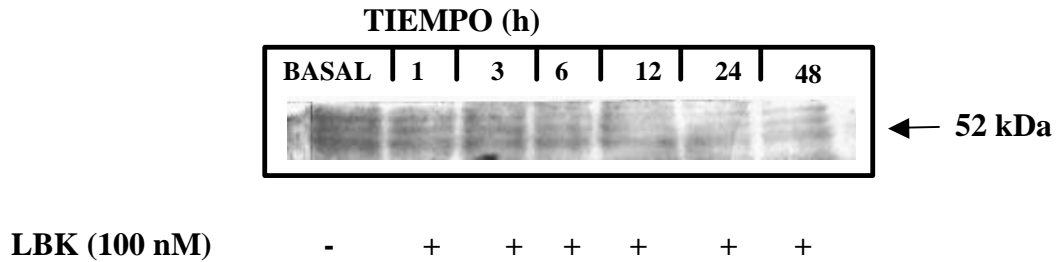
b)



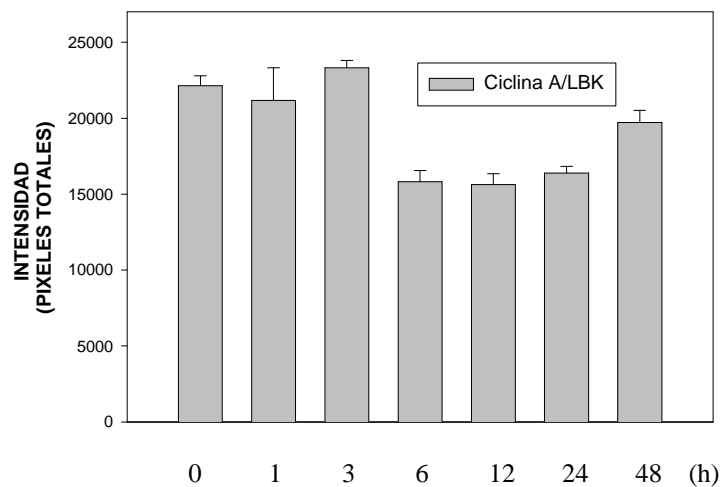
**Fig. 9 Expresión de ciclina D1 en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK**

a) Western-blotting de extractos totales de queratinocitos estimulados con 100 nM de LBK a diferentes tiempos. Las bandas inmunoreactivas (flecha) corresponden a un doblete de masa molecular de aproximadamente 36 kDa. b) Análisis densitométrico de las bandas de interés. Los valores corresponden al promedio de intensidad en pixeles totales  $\pm$  error estándar (n = 3).

a)

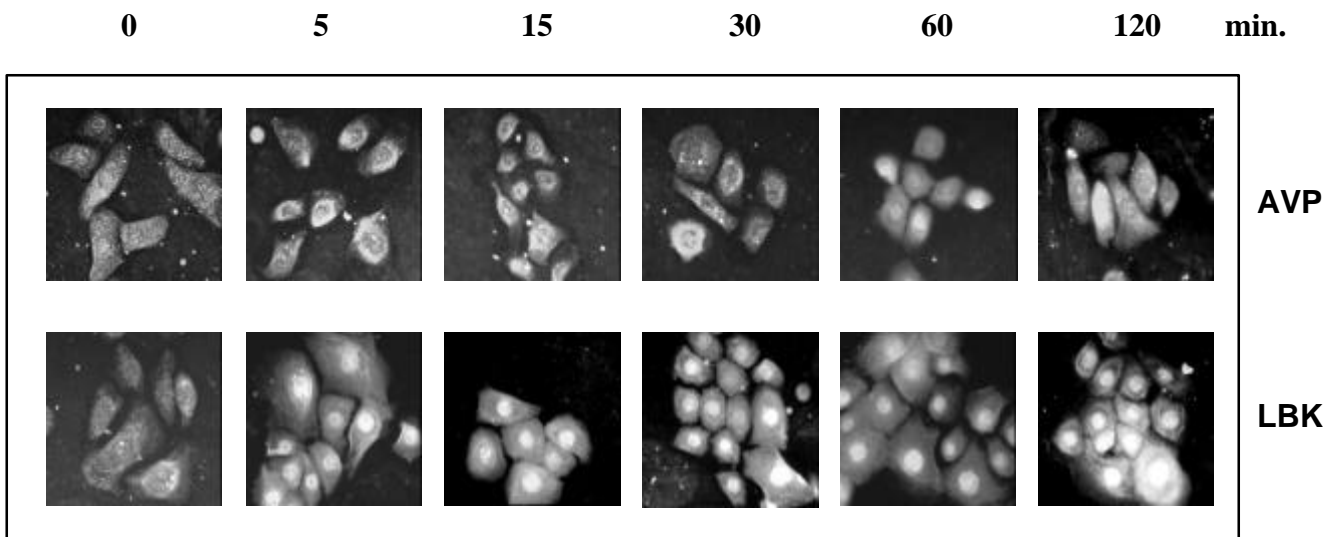


b)



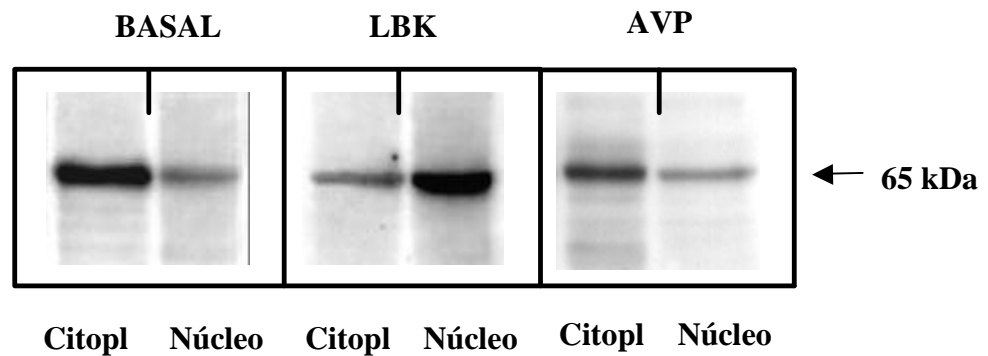
**Fig. 10 Expresión de ciclina A en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK**  
a) Western-blotting de extractos proteicos totales de queratinocitos estimulados con 100 nM de LBK a diferentes tiempos. Las bandas inmunoreactivas (flecha) corresponden a un doblete de masa molecular de aproximadamente 52 kDa. b) Análisis densitométrico de las bandas de interés. Los valores corresponden al promedio de intensidad en pixeles totales  $\pm$  error estándar (n = 3).



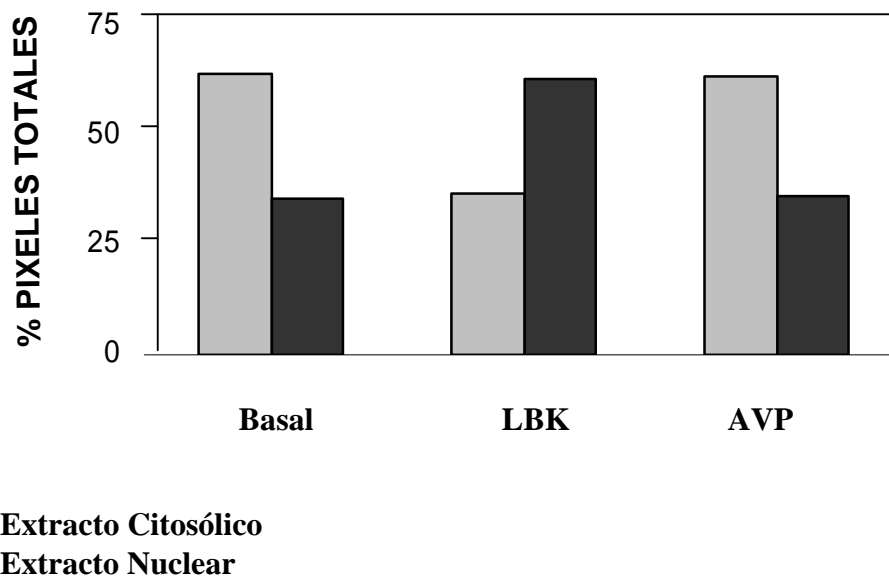


**Fig. 11 Visualización de la translocación nuclear de NF-κB en cultivos de queratinocitos humanos** Queratinocitos humanos en cultivo y estimulados con 100 nM de AVP o LBK durante diferentes períodos de tiempo y revelados sucesivamente con el anticuerpo policlonal NF-κB p(65) y F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG de conejo marcado con fluoresceína.

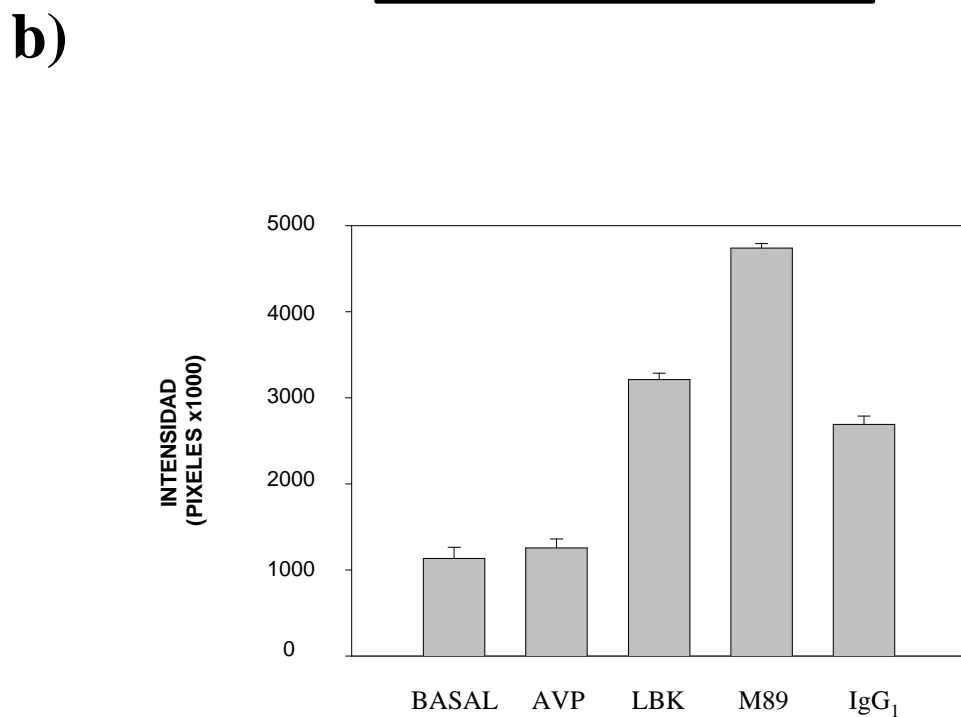
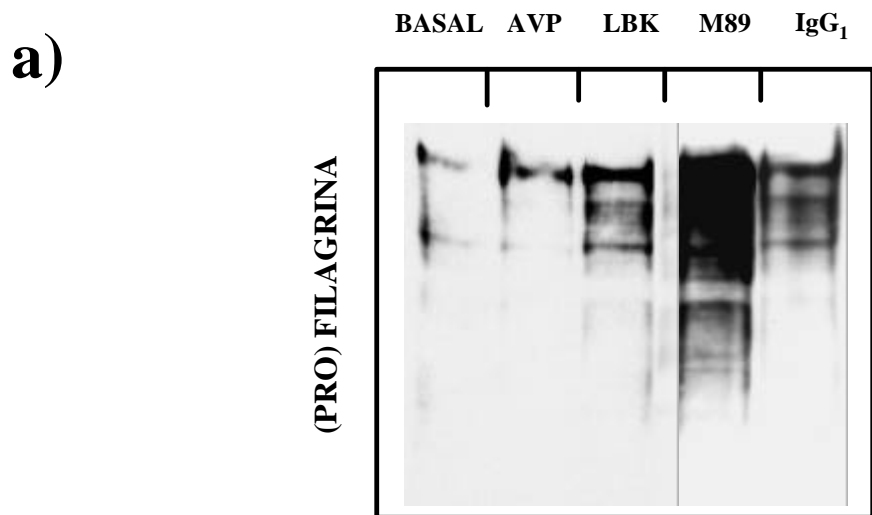
a)



b)



**Fig. 12 Identificación de la translocación nuclear de NF-k B en queratinocitos humanos estimulados con LBK y AVP** a) Western-blotting de extractos proteicos citosólicos y nucleares de queratinocitos basales y estimulados con LBK y AVP (100 nM) durante 60 min. Las bandas inmunoreactivas (flecha) corresponden a un polipéptido de masa molecular de aproximadamente 65 kDa, compatible a la proteína p65. b) Análisis densitométrico de cada una de las bandas de interés. Los valores corresponden al % en pixeles totales del 100% de la suma de ambos extractos. Cabe destacar el aumento de la proteína p65 en el extracto nuclear de las células estimuladas con LBK (63%), a diferencia de las células basales o las estimuladas con AVP en que la proteína p65 se concentró en el extracto citoplasmático.



**Fig. 13 Identificación de (pro)filagrina en queratinocitos humanos en cultivo estimulados con AVP, LBK y M89** a) Western-blotting de extractos proteicos totales de queratinocitos estimulados con 100 nM de AVP, LBK y M89 por 48 h. b) Cuantificación de los péptidos inmunoreactivos. El anticuerpo utilizado reacciona con (pro)filagrina (masa molecular aproximada de 400 kDa) y con sus productos de degradación proteolítica. Los valores corresponden al promedio de la intensidad en pixeles totales  $\pm$  error estándar (n = 3).

## 5. DISCUSIÓN

La epidermis constituye un excelente modelo de estudio de los procesos de proliferación y diferenciación celular, pues en su organización estructural se reflejan las propiedades mitóticas, de síntesis de moléculas específicas y de diferenciación de los queratinocitos. En el laboratorio de Patología se ha encontrado recientemente que los queratinocitos humanos expresan receptores  $V_1$  de vasopresina y  $B_2$  de cininas. Sin embargo, su función precisa en estas células es desconocida. No obstante, en diversas poblaciones celulares se ha observado que los receptores  $V_1$  poseen una función proliferativa; en cambio, los receptores  $B_2$  parecen estimular tanto la proliferación como la diferenciación celular. En la presente Tesis nosotros estudiamos el efecto de la estimulación específica de ambos receptores sobre la generación de segundas señales en queratinocitos y la eventual relación de estas últimas con la proliferación y diferenciación celular.

### 5.1 Efecto de AVP sobre genes de respuesta temprana y ciclinas

Los ensayos realizados en queratinocitos estimulados con AVP demostraron que los genes de respuesta temprana, c-fos y Egr-1 son regulados por vasopresina con cinéticas diferentes; c-fos tuvo una expresión mayor a las 6 h de estimulación; en cambio Egr-1 presentó expresión más tardía, a las 12 h de estimulación. Estudios similares realizados en células A-10, derivadas de células musculares de aorta de rata, estimuladas con 100 nM de AVP, evidenciaron mayor expresión de c-fos a las 12 h y de Egr-1 a las 3 h de activación, respectivamente. Además, utilizando inhibidores de PKC (GF109203X) y de MEK (PD98059) se observó una atenuación en la expresión de estos genes (C. González, comunicación personal). Estas observaciones, sugieren que MAPK inducen la expresión de los genes de respuesta temprana c-fos y Egr-1. Una vez

fosforiladas por MEK, las MAPK translocan al núcleo en donde inducen la expresión de factores de transcripción tales como c-fos a través de la fosforilación del factor de transcripción p62 (Gille y col, 1992). Por otro lado, Schulze-Lohoff y col (1993) mediante cultivos de células mesangiales de rata estimuladas con dosis similares de AVP, determinaron un máximo de expresión de mRNA para c-fos y Egr-1 luego de 30 min de estimulación, que desapareció luego de 2-4 h. Rupprecht y col. (1992) revelaron un aumento sostenido de mRNA para Egr-1 por sobre las 8 h después de la estimulación con AVP y una respuesta de Egr-1 disminuída cuando las células fueron tratadas con inhibidores de PKC. En conjunto, estos resultados y los obtenidos por nosotros confirman que AVP estimula la expresión de los genes de respuesta temprana c-fos y Egr-1 aunque con cinética diferente según el tipo celular analizado.

Nuestros resultados sugieren que AVP también tiene la capacidad de inducir la expresión moderada de ciclina D1 en queratinocitos en cultivo luego de 12 y 24 h de estimulación. Resultados similares han sido encontrados en la línea celular A-10 (C. González, comunicación personal). En efecto, en estas células AVP induce la expresión de ciclina D1 después de 3 h de estimulación, la cual aumenta a las 12 h. Sin embargo, otros autores han encontrado que AVP inhibe la expresión de los genes de ciclina D1 en células Y1 de tumores adrenocorticales de ratón (Schwindt y col, 2003). La inhibición de la expresión de ciclina D1 fue suficiente para bloquear en estas células la progresión en la fase G<sub>1</sub> y la entrada a la fase S, inhibiendo su proliferación.

Los resultados obtenidos del estudio de la expresión de ciclina A luego de la estimulación de queratinocitos con AVP, no reveló diferencias significativas con respecto a las células controles no estimuladas. Esta ausencia de expresión de ciclina A puede ser interpretado como una falta de progreso de las células estimuladas por AVP en el ciclo celular (Yam y col, 2002).

Sin embargo, considerando el resultado negativo observado también para ciclina A luego de la estimulación de los queratinocitos con LBK, no se puede descartar que la actividad del anticuerpo anti-ciclina A utilizado (codigo CC17, Oncogene<sup>TM</sup>; dilución de uso 1/40) esté afectada.

Existen antecedentes en la literatura que destacan la acción proliferativa de AVP. En efecto, los estudios realizados por Bhora y col. (1994) mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada en hepatocitos de rata demuestran el efecto proliferativo de este péptido vasoactivo. Chiu y col. (2002) también demostraron proliferación celular AVP-dependiente en células IEC-18 (células epiteliales intestinales), concluyendo que la síntesis de DNA y proliferación celular se producía a través de múltiples señales intracelulares que activaban Erk, Ca<sup>2+</sup> y PKC. En queratinocitos cultivados y estimulados con AVP se ha visto fosforilación rápida y transitoria de MAPK (Vidal y col, 2003) proceso que fue relacionado con proliferación celular.

## **5.2 Efecto de LBK sobre genes de respuesta temprana y ciclinas**

La estimulación de queratinocitos en cultivo con LBK indujo expresión temprana de la proteína c-fos; en cambio, la expresión de Egr-1 fue más tardía. Es así como, luego de 1 hora de estimulación con LBK ocurrió una fuerte expresión de un doblete polipeptídico de 62 kDa correspondiente a la proteína c-fos; la expresión de Egr-1 fue más moderada evidenciándose una banda de 80 kDa a las 6 h de estimulación.

Estudios realizados por Coutant y col. (1996) en células HaCat estimuladas con BK demuestran que éste péptido produce una rápida y transitoria acumulación de mRNA para de c-fos y c-jun. Esta expresión ocurre de manera similar para ambas proteínas, alcanzando su máxima

intensidad a los 30 min, para luego de 1 a 2 h caer a niveles basales. Sin embargo, al realizar estudios con incorporación de timidina tritiada estos autores demostraron que BK es un débil estimulador de la proliferación celular. En cambio, Talwar y col. (1990) demostraron que BK actuaba como un potente agonista de la vía de señalización PLC/PKC en cultivos de queratinocitos humanos adultos y que la activación de esta vía estaba asociada a un incremento en su proliferación. Considerando estos resultados y los obtenidos por nosotros no es posible descartar que LBK posea un efecto proliferativo en los queratinocitos humanos mediado por c-fos y Egr-1. Sin embargo se requiere mayor información para establecer este punto.

Con respecto a la expresión de ciclina D1, la estimulación con LBK produjo, luego de 6 y 12 h, un aumento en la expresión de varios polipéptidos de 36 kDa reactivos a anticuerpos anti-ciclina D1. Por otra parte, como se ha mencionado, no observamos diferencias en la expresión de ciclina A entre las células estimuladas con LBK y los controles.

No existen datos en la literatura sobre LBK y expresión de ciclinas en queratinocitos. Sin embargo, estudios realizados en células de músculo liso vascular de rata revelaron incorporación de timidina tritiada y activación de MAPK fosforiladas luego de la estimulación con BK (Yang y col, 2003). Ambos efectos fueron inhibidos mediante pre-incubación de las células con inhibidores de tirosinas quinasas. De estos resultados, los autores concluyeron que BK posee un efecto mitogénico mediado a través de la activación de la vía de MEK/MAPK. Se ha observado que la estimulación de las líneas celulares de tumores humanos SCLC de carcinoma de células pequeñas de pulmón, EFM-192 A de carcinoma mamario y SW-480 de carcinoma de colon (Drube y Liebman, 2000) y de las células germinales de testículo de rata (Atanossova, 2003) con

BK induce un incremento en la síntesis de DNA. Ambos grupos de autores comprobaron que la proliferación de estas líneas celulares disminuye significativamente al utilizar el antagonista específico para el receptor B<sub>2</sub> HOE-140, demostrando que la proliferación fue dependiente de la activación de receptores B<sub>2</sub> de cinina. BK posee un potente efecto mitogénico sobre la línea de fibroblastos 3T3 de ratón que estimula la fosforilación tirosina-dependiente en éstas células (Leeb-Lundberg y col, 1991). No obstante estos resultados, BK podría tener un efecto anti-proliferativo en queratinocitos. Johnson y col (1992) demostraron, mediante uso de timidina tritiada, que BK no estimula la síntesis de DNA en queratinocitos.

### **5.3 Efecto de LBK y AVP sobre la translocación nuclear de NF-κB**

En el presente trabajo pudimos observar que la estimulación con LBK indujo en los queratinocitos en cultivo translocación nuclear de NF-κB. Mediante inmunofluorescencia se observó una temprana localización nuclear de la marca para la proteína p65 la cual alcanzó su máxima intensidad entre los 30 y 120 min. Para corroborar este resultado se realizó Western-blotting de extractos citosólicos y nucleares de queratinocitos estimulados con LBK, observándose una mayor intensidad de la banda correspondiente a p65 en el extracto nuclear la cual concentró un 63% del polipéptido total. En cambio, no se encontraron evidencias de translocación nuclear de la proteína p65 en queratinocitos estimulados con AVP, tanto utilizando inmunofluorescencia como Western-blotting.

Es conocido que NF-κB se encuentra en el citoplasma como un heterodímero compuesto de una subunidad p50 y otra p65 unido a su subunidad inhibitoria, IκB (Urban y col., 1991). La fosforilación de IκB permite la disociación del complejo de proteínas NF-κB, su activación y



translocación al núcleo donde modula la expresión de una variedad de genes que participan en distintos procesos celulares (Chen y col., 2001). En linfocitos y en otros tipos celulares no-epiteliales NF- $\kappa$ B promueve la proliferación celular, inhibe la apoptosis y activa la respuesta de estrés celular (Baeuerce y Baltimore, 1996). En cambio, en las células epidérmicas su acción parece ser diferente. Estudios realizados por Seitz y col (1998), demostraron el rol funcional de NF- $\kappa$ B en epitelios estratificados, mediante la generación de epidermis humana transgénica y murina, observando que la activación de NF- $\kappa$ B detiene el crecimiento celular y permite la migración y diferenciación de las células epidérmicas. En efecto, en las células basales en proliferación, NF- $\kappa$ B transloca al núcleo y actúa sobre reguladores del ciclo celular alterando el crecimiento epitelial o induciendo citoquinas inhibitorias del crecimiento (Seitz y col, 1998). Además, estos autores demostraron que la aplicación tópica de un inhibidor de NF- $\kappa$ B induce hiperplasia (proliferación) de la epidermis normal. Takao y col (2003) también demostraron la expresión de NF- $\kappa$ B y de su RNAm en queratinocitos humanos en cultivo y en epidermis normal tanto en queratinocitos basales como en suprabasales. Estos autores observaron que la estimulación de los queratinocitos con PMA, TNF- $\alpha$  y INF- $\gamma$  induce activación de NF- $\kappa$ B e inhibición de la proliferación. Con respecto al rol mediador que tienen las cininas en los procesos inflamatorios, estudios realizados con BK en cultivos de una línea celular de fibroblastos de pulmón humano revelan que este péptido estimula la activación de NF- $\kappa$ B e induce la expresión de genes de IL-1 $\beta$  (Pan y col, 1996). En células epiteliales humanas A549 BK induce activación de NF- $\kappa$ B a través de IP3-K (Pan y col, 1999).

En conjunto los datos de la bibliografía y nuestros propios resultados sugieren que la unión de LBK al receptor B<sub>2</sub> en los queratinocitos humanos participa en la activación y

translocación nuclear de NF- $\kappa$ B. Su unión a sitios específicos de DNA podría provocar la inhibición de la proliferación celular y consecuentemente, inducir la diferenciación de los queratinocitos.

#### **5.4 Efecto de AVP y LBK sobre la expresión de (pro)filagrina**

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis indican que LBK induce la expresión moderada de (pro)filagrina, mientras que AVP resulta un pobre inductor de ésta. (pro)Filagrina es producida como proproteína en el estrato granuloso de la epidermis normal, donde se acumula en forma de gránulos citoplasmáticos (Fleckman y col, 1985). En su forma madura se encuentra libre en el citoplasma de los queratinocitos del estrato córneo, donde interacciona con filamentos de queratina, al mismo tiempo que forma un pool de amino ácidos y péptidos de diferentes tamaños hidrófilos que permiten mantener húmedos los estratos más externos de la epidermis (Smith y col, 1986). Debido a estas características se la considera un adecuado marcador de la diferenciación terminal de los queratinocitos (Asselineau y col, 1990). La magnitud del efecto de LBK sobre la producción de (pro)filagrina fue comparada con el efecto del anticuerpo anti-CD40 M89, el cual provocó una fuerte expresión de (pro)filagrina. CD40 posee un potente efecto inductor de la diferenciación del queratinocito (Péguet-Navarro y col, 1997 y Concha y col, 2003). La estimulación de los queratinocitos con células transfectadas con el receptor de CD40 (CD40L) o con el anticuerpo anti-CD40 provoca el aplanamiento y aumento de tamaño de los queratinocitos así como un importante acumulo citoplasmático de (pro)filagrina (Concha y col, 2003).

Considerando que se ha demostrado que en las células neuronales PC12 estimuladas con NGF (factor de crecimiento neuronal) la fosforilación de MAPK sostenida está relacionada con procesos de diferenciación celular (Harada y col, 2001), se estima que la fosforilación de MAPK sostenida observada en queratinocitos humanos estimulados con LBK podría estar también relacionada con diferenciación (Vidal y col, 2003). Por lo demás, en las células PC12 BK potencia el efecto inductor de las prolongaciones neuronales que posee el factor de crecimiento neuronal (Kozlowski y col, 1989).

Se puede proponer que LBK tendría un efecto regulador en la diferenciación del queratinocito humano. Dicho efecto podría resultar importante en la reparación epidérmica, secundaria a los procesos inflamatorios que afectan a la piel. Se debe recordar que las cininas son importantes mediadores de la inflamación tisular.



En conjunto, nuestros resultados sugieren que la estimulación con LBK en queratinocitos cultivados induce la expresión de genes de respuesta temprana y de proteínas reguladoras del ciclo celular, como ciclina D1. LBK induce la translocación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B y es capaz de producir, aunque en forma moderada, la expresión de (pro)filagrina. En cambio AVP, no induce translocación nuclear del factor NF- $\kappa$ B ni tampoco posee efecto sobre la expresión de proteínas de diferenciación en el queratinocito. Sin embargo, induce en éstos la expresión de los genes de respuesta temprana c-fos y Egr-1 y de ciclina D1 que en conjunto podrían activar la proliferación queratinocitaria.

**BIBLIOGRAFIA**

Angel, P. and Szabowski, A. (2002) Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin. *Biochem. Pharmacol.*, 64, 949-956.

Asselineau, D., Dale, B. A. and Bernard, B. A. (1990) Filaggrin production by cultured human epidermal keratinocytes and its regulation by retinoic acid. *Differentiation.*, 45, 221-229.

Atanossova, N. N. (2003) B<sub>2</sub> bradykinin receptor mediates the stimulatory effect of bradykinin on rat germ cell proliferation in vitro. *Andrologia.*, 32, 13-16.

Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. (1996) NF- $\kappa$ B: Ten Years After. *Cell.*, 87, 13-20.

Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. and Worthy, K. (1992) Bioregulation of kinin: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.*, 44, 1-80.

Bhora, F. Y., Kothary, P. C., Imanishi, H., Eckhauser, F. E. and Raper, S. E. (1994) Vasopressin stimulates DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *J. Surg. Res.*, 57, 706-710.

Caux, C., Massacrier, C., Vanverliet, B., Dubois, B., van Kooten, C., Durand, I. and Banchereau, J. (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.*, 180, 1263-1272.

Chen, F., Castranova, V. and Shi, X. (2001) New insights into the role of Nuclear Factor- $\kappa$ B in cell growth regulation. *Am. J. Pathol.*, 159, 387-397.

Chiu, T., Wu, S. S., Santiskulvong, C., Tangkijvanich, P., Yee, H. F. Jr. and Rozengurt, E. (2002) Vasopressin-mediated mitogenic signaling in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282, C434-C450.

Concha, M., Vidal, M. A., Moreno, I., Salem, C., Figueroa, C. D., Schmitt, D. and Peguet-Navarro, J. (2003) Evidence for modulation of human epidermal differentiation and remodelling by CD40. *Br. J. Dermatol.*, 148, 1105-1114.

Coutant, K. D., Corvaia, N. and Ryder, N. S. (1995) Bradykinin induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor-receptor and focal adhesion proteins in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 210, 774-780.

Coutant, K. D. and Ryder, N. S. (1996) Bradykinin upregulates immediate-early gene mRNA in human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.*, 288, 2-6.

Cowling, R. T., Gurantz, D., Peng, J. F., Dillman, W. H. and Greenberg, B. H. (2002) Transcription factor NF- $\kappa$ B is necessary for upregulation of type 1 angiotensin II receptor (AT<sub>1</sub>) mRNA in rat cardiac fibroblasts treated with TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . *J. Biol. Chem.*, 277, 5719-5724.

Davis, R. J. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.*, 268, 14553-14556.

Diep, Q. N., El Mabrouk, M., Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2001) Expression of cell cycle proteins in blood vessels of Angiotensin II-infused rats. *Hypertension.*, 37, 604-608.

Draetta, G. F. (1994) Mammalian G1 cyclins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 842-846.

Drube, S. and Liebmann, C. (2000) In various tumour cell lines the peptide bradykinin B(2) receptor antagonist, Hoe140 (Icatibant), may act as mitogenic agonist. *Br. J. Pharmacol.*, 131, 1553-1560.

El-Dahr, S. S., Dipp, S. and Baricos, W. H. (1998) Bradykinin stimulates the ERK→ Elk-1→ Fos/AP-1 pathway in mesangial cells. *Am. J. Physiol.*, 275, F343-F352.

Erdös, E. G. (1990) Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 6, S20-S24.

Ferner, R. E., Wilson, D., Paterson, J. R., Wilkinson, R. and Rawlins, M. D. (1989) The effects of intradermal bradykinin are potentiated by angiotensin converting enzyme inhibitors in hypertensive patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 27, 337-342.

Fleckman, P., Dale, B. A. and Holbrook, K. A. (1985) Profilaggrin, a high-molecular-weight precursor of filaggrin in human epidermis and cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 85, 507-512.

Gille, H., Sharrocks, A. D. and Shaw, P. E. (1992) Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature.*, 358, 414-417.

González, C., Reyes, C., Figueroa, C. D., Barra, V. and Troncoso, S. (1999) Vasopressin stimulates tyrosine phosphorylation by activation of PKC in the rat smooth muscle cell line, A-10. *Cell Biol. Int.*, 23, 195-201.

Grammer, A. C., Swantek, j. L., Mc Farland, R. D., Miura, Y., Geppert, T. and Lipsky, P. E. (1998) TNF receptor-associated factor-3 signaling mediates activation of p38 and Jun N-terminal kinase, cytokine secretion, and Ig production following ligation of CD40 on human B cells. *J. Immunol.*, 161, 1183-1193.

Greene, E. L., Velarde, V. and Jaffa, A. A. (2000) Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension.*, 35, 942-947.

Haake, A., Scott, G. A. and Holbrook, K. A. (2001) Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. En: Freinkel, R. K. and Woodley, D. T. (ed) *The biology of the skin*: 19-45. The Parthenon Publishing Group, London.

Haake, A. R. and Holbrook, K. (2001) Estructura y desarrollo de la piel. En: Fitzpatrick, T. B. (ed) *Dermatología en medicina general*: 74-118 Editorial Medica Panamericana 5° Edición.

Harada, T., Morooka, T., Ogawa, S. and Nishida, E. (2001) ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr-1. *Nat. Cell Biol.*, 3, 453-459.

Jaffa, A. A., Miller, B. S., Rosenzweig, S. A., Naidu, P. S., Velarde, V. and Mayfield R. K. (1997) Bradykinin induces tubulin phosphorylation and nuclear translocation of MAP kinase in mesangial cells. *Am. J. Physiol.*, 273, F916-F924.

Johnson, R. M., King, K. L. and Morhenn, V. B. (1992) Comparison of second messenger formation in human keratinocytes following stimulation with epidermal growth factor and bradykinin. *Sec. Mess. Phosphoprot.*, 14, 21-37.

Joyce, D., Albanese, C., Steer, J., Fu, M., Bouzahzah, B. and Pestell, R. G. (2001) NF- $\kappa$ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine and Growth Factor Rev.*, 12, 73-90.



Kazanietz, M. G. and Blumberg, P. M. (1996) Protein kinase C and signal transduction in normal and neoplastic cells. En: Sirica A. E. (ed) Cellular and Molecular Pathogenesis: 397-398. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Kozlowski, M. R., Rosser, M. P., Hall, E. and Longden, A. (1989) Effects of bradykinin on PC-12 cell differentiation. *Peptides*. 10, 1121-1126.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680-685.

Larsen, F. G., Voorhees, J. J. and Astrom, A. (1994) Retinoic acid induces expression of early growth response gene-1 (Egr-1) in human skin in vivo and in cultured skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, 102, 730-733.

Leeb-Lundberg, L. M. F. and Song, X. H. (1991) Bradykinin and Bombesin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of a 120-kDa group of proteins in swiss 3T3 cells. *J.Biol. Chem.*, 266, 7746-7749.

Liou, H. C. and Baltimore, D. (1993) Regulation of the NF- $\kappa$ B/rel transcription factor and I $\kappa$ B inhibitor system. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 477-487.

Lolait, S. J., O'Carroll, A. M., McBride, O. W., Koning, M., Morel, A. and Brownstein, M. J. (1992) Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature.*, 357, 336-339.

Marceau, F. (1996) Evidence for vascular tone regulation by resident or infiltrating leukocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 55, 1481-1488.

Mc Allister, B. S., Leeb-Lundberg, L. M., Javors, M. A. and Olson, M. S. (1993) Bradykinin receptors and signal transduction pathways in human fibroblasts: integral role for extracellular calcium. *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 294- 301.

Mitev, V. and Miteva, L. (1999) Signal transduction in keratinocytes. *Exp. Dermatol.*, 8, 96-108.

Morel, A., O'Carroll, A. M., Brownstein, M. J. and Lolait, S. J. (1992) Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature.*, 356, 523-526.

Naidu, P., Velarde, V., Kappler, C. S., Young, R. C., Mayfield, R. K. and Jaffa, A. A. (1999) Calcium-calmodulin mediates bradykinin-induced MAPK phosphorylation and c-fos induction in vascular cells. *Am. J. Physiol.*, 277, H1061-H1068.

Noelle, R. J., Ledbetter, J. A. and Aruffo, A. (1992) CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol. Today.*, 13, 431-433.

Pan, Z. K., Zuraw, B. L., Lung, C. C., Prossnitz, E. R., Browning, D. D. and Ye, R. D. (1996) Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1 beta gene expression in cultured human fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 98, 2042-2049.

Pan, Z. K., Christiansen, S. C., Ptasznik, A. and Zuraw, B. L. (1999) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activity for bradykinin stimulation of NF-kappaB activation in cultured human epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 9918-9922.

Péguet-Navarro, J., Dalbiez-Gauthier, C., Moulon, C., Berthier, O., Réano, A., Gaucherand, M., Banchereau, J., Rousset, F. and Schmitt, D. (1997) CD40 Ligation of human keratinocytes inhibits their proliferation and induces their differentiation. *J. Immunol.*, 158, 144-152.

Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the information of keratinizing from single cells. *Cell.*, 6, 331-343.

Riggs, P. K., Rho, O. and DiGiovanni, J. (2000) Alteration of Egr-1 mRNA during multistage carcinogenesis in mouse skin. *Mol. Carcinog.*, 27, 247-251.

Rupprecht, H. D., Dann, P., Sukhatme, V. P., Sterzel, R. B. and Coleman, D. L. (1992) Effect of vasoactive agents on induction of Egr-1 in rat mesangial cells: correlation with mitogenicity. *Am. J. Physiol.*, 263, F623- F636.

Saito, M., Sugimoto, T., Tahara, A. and Kawashima, H. (1995) molecular cloning and characterization of rat V1b vasopressin receptor: evidence for its expression in extra-pituitary tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 212, 751-757.

Schremmer-Danninger, E., Heinz-Erian, P., Topfer-Petersen, E. and Roscher, A. A. (1995) Autoradiographic localization and characterization of bradykinin receptors in human skin. *Eur. J. Pharmacol.*, 283, 207- 216.

Schremmer-Danninger, E., Topfer-Petersen, E., Fritz, H. and Roscher, A. A. (1998) Bradykinin-induced tyrosine phosphorylation of proteins in cultured human keratinocytes. *Biol. Res.*, 31, 189-198.

Schulze-Lohoff, E., Kohler, M., Fress, H., Reindl, N. and Sterzel, R. B. (1993) Divergent effects of arginine vasopressin and angiotensin II on proliferation and expression of the immediate early genes c-fos, c.jun and Egr-1 in cultured rat glomerular mesangial cells. *J. Hypertens.*, 11, 127-134.

Schwindt, T. T., Forti, F. L., Juliano, M. A., Juliano, L. and Armelin, H. A. (2003) Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. *Biochemistry.*, 42, 2116-2121.

Seitz, C. S., Lin, Q., Deng, H. and Khavari, P. A. (1998) Alterations in NF- $\kappa$ B function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 2307-2312.

Sherr, C. J. (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.*, 20, 187-190.

Takao, J., Yudate, T., Das, A., Shikano, S., Bonkobara, M., Ariizumi, K. and Cruz, P. D. (2003) Expression of NF-kappa B in epidermis and relationship between NF-kappa B activation and inhibition of keratinocyte growth. *Br. J. Dermatol.*, 148, 680-688.

Talwar, H. S., Fisher, G. J. and Voorhees, J. J. (1990) Bradykinin induces phosphoinositide turnover, 1,2-diglyceride formation, and growth in cultured adult human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 95, 705-710.

Thiel, G. and Cibelli, G. (2002) Regulation of life and death by the zinc finger Transcription Factor Egr-1. *J. Cell. Physiol.*, 193, 287-292.

Treede, R. D., Meyer, R. A., Davis, K. D. and Campbell, J. N. (1990) Intradermal injections of bradykinin or histamine cause a flare-like vasodilatation in monkey. Evidence from laser Doppler studies. *Neurosci. Lett.*, 115, 201-206.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.

Tulchinsky, E. (2000) Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol. Histopathol.*, 15, 921-928.

Uckun, F. M., Schieven, G. L., Dibirdik, I., Chandan-Langlie, M., Tuel-Ahlgren, L. and Ledbetter, J. A. (1991) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation, phosphoinositides turnover, and multiple previously unidentified serine/threonine-specific protein kinases by the Pan-B-cell receptor CD40/Bp50 at discrete developmental stages of human B-cell ontogeny. *J. Biol. Chem.*, 266, 17478-17485.

Urban, M. B., Schreck, R. and Baeuerle, P. A. (1991) NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO. J.*, 10, 1817-1825.

van Kooten, C. and Banchereau, J. (1997) Function of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *J. Immunol.*, 9, 330-337.

Velarde, V., Ullian, M. E., Morinrlli, T. A., Mayfield, R. K. and Jaffa, A. A. (1999) Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 277, C253-C261.

Viallard, J. F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J. L. and Reiffers, J. (2001) Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother.*, 5, 109-129.

Vidal, A., Astroza, A., Ehrenfeld, P., Pavicic, M. F., Salem, C., Figueroa, J., Concha, M., González, C. B. and Figueroa C. D. (2003) Specificity and diversity of signalins events triggered by activation of vasopressin  $V_1$  and kinin  $B_2$  receptors in human cultured keratinocytes., *J. Invest. Dermatol.* (enviado).

Yang, C. M., Chien, C. S., Ma, Y. H., Hsiao, L. D., Lin, C. H. and Wu, C. (2003) Bradykinin B(2) receptor-mediated proliferation via activation of the Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in rat vascular smooth muscle cells., *J. Biomed. Sci.*, 10, 208-218.