



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Lic. en Ciencias Biológicas

**PROFESOR PATROCINANTE
DR. CARLOS FIGUEROA
INSTITUTO DE HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA**

**PARTICIPACIÓN DE
RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS EN LA REGULACIÓN DE LA
PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS EPIDÉRMICAS HUMANAS**

**Tesis de grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ciencias Biológicas**

TAMARA MACARENA SANCHEZ LEAL

VALDIVIA-CHILE

2004

A Teresa e Ibán

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a todas las personas que han estado a mi lado, y que han colaborado con su presencia y cariño a la finalización de mi pregrado.

En particular quiero dar gracias a las personitas del laboratorio Angel, Francisca, Carola, Pamela, que con sus cafecitos ayudaron de alguna u otra forma, aparte de cooperar con sus ideas. A la profesora Alejandra por ayudarme con tanta disposición siempre. Especialmente quiero agradecer de todo corazón a mi profesor patrocinante el Dr. Carlos Figueroa, a quien siempre encontré con la mejor disposición para ayudar, y que junto con las personas del laboratorio hicieron que cada día ahí fuera una alegría.

Quiero agradecer también a todos mi amiguitos (están todos incluidos), especialmente a Ingrid, tan sólo por ser mi amiga y cobijarme cuando lo necesité.

Finalmente a mi familia y mis padres a quienes debo todo lo que soy...

Esta Tesis fue financiada por el Proyecto Fondecyt “Mecanismos de respuesta biológica de los receptores B1 y B2 de cininas. Implicancias en inflamación proliferación y diferenciación celular. N°1030258.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

		Página
	ÍNDICE	I
	ÍNDICE DE FIGURAS	V
	INDICE DE ABREVIATURAS	VII
1.	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
2.	INTRODUCCION	3
2.1	METABOLISMO DE LAS CININAS	3
2.2	NATURALEZA Y CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE CININAS	7
2.2.1	Receptor B1	7
2.2.2	Receptor B2	8
2.3	PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR	9
2.3.1	Ciclo celular en las células epidérmicas	10
2.3.2	Métodos para determinar proliferación celular <i>in vitro</i>	11
2.3.3	Diferenciación de las células epidérmicas	12
2.4	OBJETIVOS	14
3	MATERIALES Y METODOS	15
3.1	EQUIPOS	15
3.2	REACTIVOS	15
3.2.1	Medios de cultivo	15
3.2.2	Péptidos y proteínas	15

3.2.3	Anticuerpos	16
3.3	CULTIVOS CELULARES	16
3.3.1	Cultivo de queratinocitos humanos	16
3.4	MÉTODO COLORIMETRICO PARA DETERMINAR PROLIFERACIÓN CELULAR	18
3.4.1	Características generales de la técnica	18
3.4.2	Sincronización celular e incorporación de BrdU	19
3.4.3	Fijación y denaturación	19
3.4.4	Detección y cuantificación de la coloración	19
3.5	EFFECTO DE AGONISTAS DE RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPIDÉRMICAS EN CULTIVO	20
3.5.1	Efecto de la concentración de los agonistas	20
3.5.2	Efecto del pre-tratamiento con IL-1 β en la respuesta de los queratinocitos a los agonistas de receptores B1 y B2	21
3.5.3	Efecto del tratamiento con diclofenaco sódico	21
3.5.4	Efecto de agonistas de los receptores B1 y B2 de cininas sobre la proliferación inducida por EGF	22
3.6	EFFECTO DE AGONISTAS DE RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CELULAS EPIDERMICAS EN CULTIVO	22
3.7	INMUNOCITOQUÍMICA	23
3.7.1	Anticuerpos	23

3.7.2	Incorporación y detección de BrdU	23
3.7.3	Método Inmunocitoquímico	24
3.8	Análisis de Datos y gráficos	25
4	RESULTADOS	26
4.1	EXPRESIÓN DE RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS EN QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO	26
4.2	EFECTO DE IL-1B EN LA SOBREEXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS	26
4.3	INCORPORACIÓN DE BrdU EN QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO	28
4.4	LOS AGONISTAS DEL RECEPTOR B1, LDBK Y BK1-5 NO INDUCEN LA PROLIFERACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO	30
4.5	EL AGONISTA B2, LBK NO INDUCE PROLIFERACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO	32
4.6	EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO CON IL-1 β EN LA RESPUESTA DE LOS QUERATINOCITOS A LOS AGONISTAS DE RECEPTORES B1 Y B2	32
4.7	EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO CON IL-1 β Y DICLOFENACO EN LA RESPUESTA DE LOS QUERATINOCITOS A LOS AGONISTAS DE RECEPTORES B1 Y B2	36
4.8	EFECTO DE LOS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR EGF	38

4.9	EFEECTO DE LBK, LDBK Y BK1-5 SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO	40
4.9.1	Expresión de citoqueratina 10	40
4.9.2	Expresión de profilagrina	43
5	DISCUSIÓN	46
5.1	LOS RECEPTORES DE CININAS Y LA PROLIFERACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS	48
5.2	LOS RECEPTORES DE CININAS Y LA DIFERENCIACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS	51
6	BIBLIOGRAFÍA	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación de la síntesis y metabolismo de cininas.	6
Figura 2.	Representación esquemática de los estados de diferenciación del queratinocito, con las proteínas específicas de cada uno de los estados (marcadores).	13
Figura 3.	Inmunolocalización de receptores B1 y B2 en queratinocitos en cultivo bajo condiciones basales y tratadas con IL-1 β .	27
Figura 4.	Incorporación de BrdU en células epidérmicas en cultivo.	29
Figura 5.	Incorporación de BrdU en queratinocitos en cultivo estimulados con LDBK, BK1-5 o EGF.	31
Figura 6.	Incorporación de BrdU en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK o EGF.	33
Figura 7.	Incorporación de BrdU en queratinocitos en cultivo pretratados con IL-1 β y estimulados con distintas dosis de agonistas B1 o B2.	35
Figura 8	Efecto de IL-1 β y diclofenaco en la incorporación de BrdU por acción de LDBK, BK1-5 o LBK.	37
Figura 9.	Efecto de agonistas de los receptores B1 y B2 de cininas sobre la incorporación de BrdU inducida por EGF.	39
Figura 10.	Expresión de citoqueratina 10 en queratinocitos en cultivo pretratados con IL-1 β y estimulados con LDBK ó BK1-5 1 mM.	41
Figura 11.	Expresión de citoqueratina 10 en queratinocitos en cultivo pre-	

	tratados con IL-1 β y estimulados con LBK 1mM.	42
Figura 12.	Expresión de profilagrina en queratinocitos en cultivo pre-tratados con IL-1 β y estimulados con LDBK ó BK1-5 1 mM.	44
Figura 13.	Expresión de profilagrina en queratinocitos pre-tratados con IL-1 β y estimulados con LBK 1 mM.	45
Figura 14.	Representación esquemática de los eventos activados por los receptores B1 y B2 de cininas así como de los factores que influyen su expresión.	54

INDICE DE ABREVIATURAS

BK: Bradicinina

BK1-5: Arginina-Prolina-Prolina-Glicina-Fenilalanina

BrdU: Bromodeoxiuridina

BSA: Albúmina de suero de bovino

CK1: Citoqueratina 1

CK10: Citoqueratina 10

CK14: Citoqueratina 14

CK5: Citoqueratina 5

COX-1: Ciclooxygenasa 1

COX-2: Ciclooxygenasa 2

DBK: des[Arg⁹]-bradicinina

DK-SFM: Medio definido para queratinocitos libre de suero

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Ensayo inmunabsorbente unido a enzima

HBSS: Solución salina altamente balanceada

IL-1 β : Interleuquina -1 Beta

IP3: Inositol tri-fosfato

LBK: Lis-bradicinina

LDBK: des[Arg⁹]-Lis-bradicinina

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MEK: MAPK/ERK

PBS: Buffer fosfato salino

PGE₂: Prostaglandina E2

PGH₂: Prostaglandina H2

PKC: Protein quinasa C

RNA: Acido ribonucleico

SFB: Suero Fetal de Bovino

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

1. RESUMEN

Las cininas forman parte de una familia de hormonas peptídicas que se generan y actúan localmente. Sus efectos biológicos, involucran la activación de receptores específicos de membrana acoplados a proteína G, conocidos como B1 y B2. El tipo B2 es expresado constitutivamente por varios tipos celulares, incluyendo los queratinocitos humanos, en cambio el tipo B1 es sobre-expresado durante inflamación, especialmente cuando aumentan los niveles de IL-1 β , o existe presencia de lipopolisacáridos bacterianos. La activación del receptor B1 es mediada por los agonistas des[Arg⁹]-bradicinina, des[Arg⁹]-Lis-bradicinina y BK1-5. La activación del receptor B2 es mediada por bradicinina y Lis-bradicinina. En esta tesis se investigó si la activación de receptores B1 y B2 resultaba en proliferación y/o diferenciación del queratinocito, y si su activación junto con la del receptor de EGF potencia o inhibe sus efectos sobre la proliferación del queratinocito. La síntesis de DNA se midió mediante ELISA, utilizando el análogo de timina, BrdU. La diferenciación se determinó mediante inmunocitoquímica, pesquizando proteínas (CK10 y profilagrina), que se expresan en diferentes etapas de la diferenciación del queratinocito. Los cultivos se estimularon con diferentes concentraciones de los agonistas B1 y B2. En otros experimentos se utilizó, además, IL-1 β y diclofenaco sódico, para sobre-expresar el receptor B1 e inhibir la síntesis de prostaglandinas. La estimulación con ambos tipos de agonistas, tras el uso de IL-1 β y diclofenaco sódico, sobre-expresó los receptores B1, pero no estimuló la proliferación celular. Por el contrario, se observó una diferenciación moderada cuando se usó el agonista del receptor B2, e intensa con los agonistas de tipo B1, siendo con BK1-5, levemente mayor. Cuando se utilizó EGF 10 nM junto a LDBK (100 y 1000 nM), la proliferación celular fue mayor a la inducida por EGF sólo. Por lo tanto, la activación de los receptores de cininas en queratinocitos humanos, estimula su diferenciación, la cual depende del receptor estimulado, y del agonista utilizado. Además, LDBK potencia el efecto de EGF sobre la proliferación de los queratinocitos.

SUMMARY

Kinins belong to a hormone peptide family, which are produced and act locally. The biological effects caused by these peptides comprise the activation of specific receptors coupled to G protein, called B1 y B2. Several cells models, constitutively express the B2 receptor subtype including human keratinocytes, but the B1 subtype is over-expressed during inflammation, specially when IL-1 β levels are increased, or bacterial lipopolysaccharides exist. The B1 receptor is activated by des[Arg⁹]-bradykinin, des[Arg⁹]-Lis-bradykinin and BK1-5. The activation of B2 receptors is mediated by bradykinin and Lis-bradykinin. The aim of this work was to investigate the role of kinin B1 and B2 receptors in keratinocyte proliferation and/or differentiation.

DNA synthesis was measured by ELISA, using the thymidine analog, BrdU. Differentiation was determined by immunocytochemistry to assess the expression of keratin 10 and proffilagrin that are expressed at different states of keratinocyte differentiation. Cultures were stimulated with different doses of B1 and B2 agonists. A pre-incubation with IL-1 β and Diclofenac Sodium was performed, in some experiments, to over-express B1 receptors and to inhibit prostaglandins synthesis, respectively. These treatment over-expressed B1 receptors, but this increase did not result in an augment of cell proliferation. Stimulation by B2 agonist did not increase cellular proliferation, but induced a moderated differentiation. Both B1 agonists used provoked cell differentiation, but it was slightly higher with BK1-5 than with des[Arg⁹]-Lis-bradykinin. Nevertheless, cells stimulated with EGF and des[Arg⁹]-Lis-bradykinin, increased cell proliferation to higher levels than that produced by EGF alone. Therefore, kinin receptor activation stimulate keratinocyte differentiation, which depends on the receptor subtype and the agonist used. Finally, the B1 agonist des[Arg⁹]-Lis-bradykinin potentiates the response of EGF on keratinocyte proliferation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 METABOLISMO DE LAS CININAS

Las cininas son hormonas peptídicas que transmiten sus efectos biológicos vía receptores específicos unidos a proteína G. Estas hormonas están involucradas en importantes procesos: Regulación de la presión sanguínea (hipotensión), aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, sensación de dolor y proliferación celular (Sethi & Rozengurt, 1991; Bhoola y col, 1992). Además, se ha determinado su implicancia en la proliferación de pre-espermatogonias y la regulación de la motilidad de espermatozoides (Blaukat, 2003).

Las cininas, bradicinina (BK) y calidina o lisina-bradicinina (LBK), se originan a partir de la acción proteolítica de serina-proteasas llamadas calicreínas sobre sustratos denominados cininógenos (Bhoola y col, 1992). Las calicreínas circulan en el plasma en forma inactiva y deben ser activadas por otras proteasas. Son dos las calicreínas que actúan sobre los cininógenos: la calicreína plasmática y la tisular (Müller-Esterl, 1989), la plasmática circula como pre-calicreína inactiva de 88 kDa unida en un complejo a partes iguales con su sustrato, el cininógeno de alto peso molecular.

La calicreína tisular es una proteína más pequeña, pero que a diferencia de la enzima plasmática es sintetizada en diversos tejidos como páncreas, glándulas salivales, sistema nervioso central, vasos sanguíneos, hipófisis, útero, riñón, piel y sistema gastrointestinal. El sistema conformado por la calicreína tisular genera cininas a partir de cininógenos producidos en el mismo tejido o filtrados desde el plasma. Los péptidos así formados actúan en forma paracrina, esto es localmente y cerca de su sitio de origen.

Los cininógenos son principalmente producidos en el hígado, y son proteínas plasmáticas multidominio, uno de los cuales (dominio 4) contiene la secuencia de cinina. El corte y empalme alternativo del gen produce cininógenos de alto y bajo peso molecular respectivamente (Marceau y col, 1998). El cininógeno de alto peso molecular es desdoblado por la calicreína plasmática y tisular para generar BK y LBK, respectivamente. El cininógeno de bajo peso molecular es un sustrato sólo para la calicreína tisular, y el producto es LBK (Howl y col, 2003.; Blaukat, 2003). También hay otro tipo de enzimas que actúan sobre las cininas, a saber: carboxipeptidasa N, que remueve el residuo Arg terminal de LBK y BK para dar origen a dos péptidos diferentes: des-[Arg⁹]-bradicinina (DBK) o Lisina des-[Arg⁹]-bradicinina (LDBK) (Bhoola y col, 1992); aminopeptidasa M, que puede metabolizar LBK y LDBK para generar BK y DBK respectivamente; enzima convertidora de angiotensina I remueve sucesivamente dipéptidos del extremo carboxilo terminal de LBK y BK para dar origen a pequeños fragmentos tales como [Phe⁸-Arg⁹]-BK (BK1-7), Arg-Pro-Pro (BK1-3) y Arg-Pro-Pro-Gly-Phe (BK1-5), entre otros y como se esquematiza en la Fig. 1 (Bhoola y col, 1992; Duncan y col, 2000; Ward, 1991) Las acciones de estas enzimas hacen que la vida media de las cininas sea de 10 a 50 segundos.

BK 1-5 ha sido identificado como el metabolito más estable de bradicinina en el plasma (Murphey y col, 2000). Estudios *in vitro* sugieren que BK1-5 es el principal producto metabólico de la enzima convertidora de angiotensina I en la vía de degradación de bradicinina (Sheik y Kaplan, 1986b; Shima y col, 1992). La vida media de BK1-5 exógena en conejos es 24 minutos (Hasan y col, 1999) por lo cual se la ha utilizado como un indicador de la formación de cininas en diversos procesos patológicos incluida la rinitis alérgica (Majima y col, 1996). Hasta hace poco se consideraba que este péptido era inactivo, pero gracias a estudios realizados por Matus (2003),

se ha podido determinar que es funcionalmente activo, ya que induce la fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en células epidérmicas humanas en cultivo. El patrón de fosforilación de MAPK, inducido por BK1-5, es idéntico al producido por LDBK y también considera la activación del mismo tipo de receptor de cininas (Matus, 2003). No obstante, se desconoce el efecto que tendría BK1-5 u otros fragmentos “inactivos” de las cininas en procesos fisiológicos o patológicos.

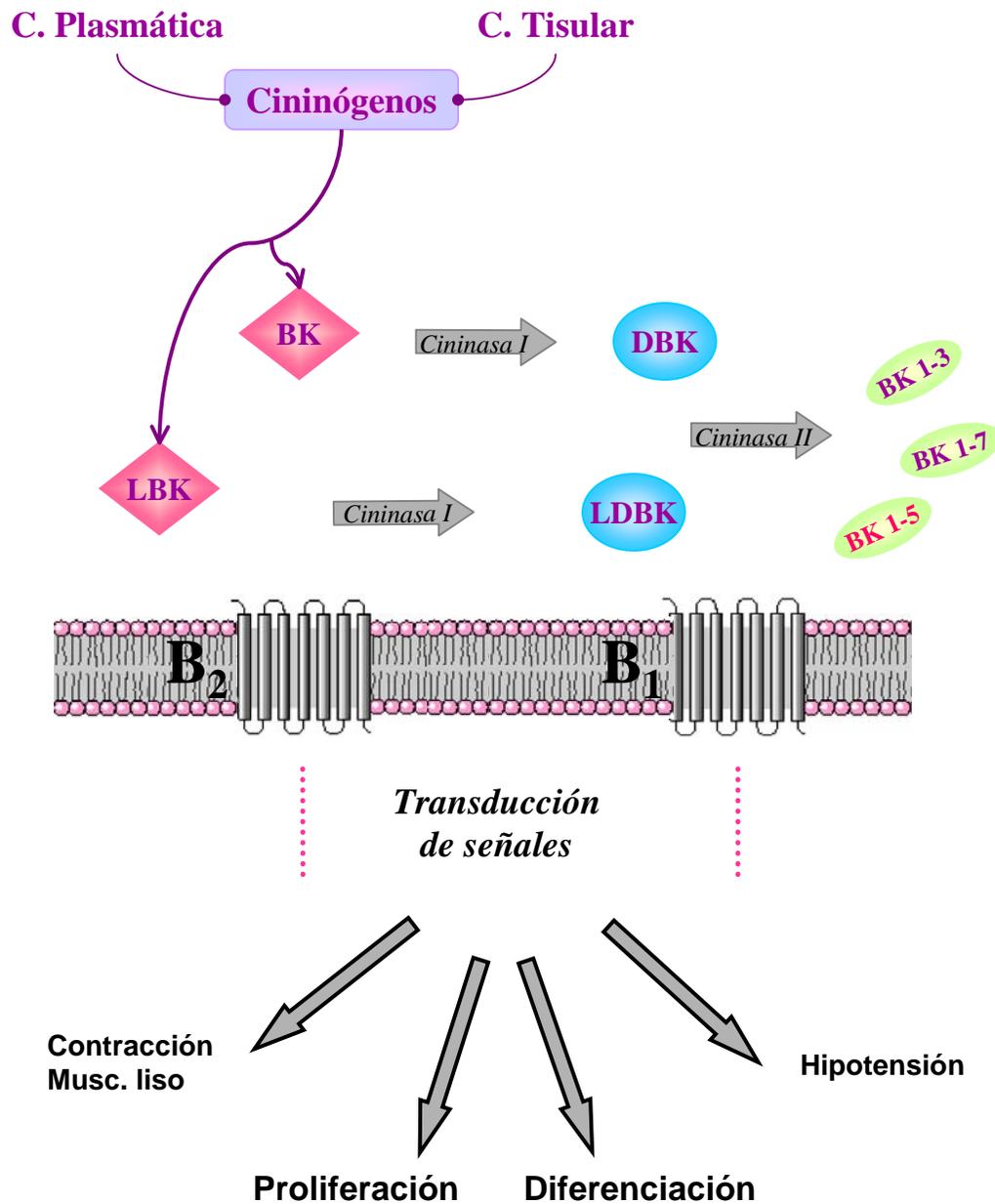


Figura. 1 Representación de la síntesis y metabolismo de cininas. Las cininas BK y LBK (agonistas receptor B₂) se forman por acción de la caliceína plasmática y tisular sobre cininógenos de alto y bajo peso molecular. Posteriormente carboxipeptidasas N y M (cininasas I) remueven los residuos arginina del extremo carboxilo de LBK y BK, transformándolos en LDBK y DBK respectivamente (agonista receptor B₁). Por último, la cininasa II actúa sobre éstas dando origen a pequeños fragmentos tales como BK 1-3, BK 1-5, BK 1-7.

2.2 NATURALEZA Y CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE CININAS

Existen dos receptores de cininas, a saber B1 y B2 (Regoli y Barabé, 1980), los que se ha postulado existen en tejidos de mamíferos así como de otras especies (Bhoola y col, 1992). Estos forman parte de la familia de receptores unidos a proteína G, que poseen 7 dominios transmembrana. Gracias a la clonación de estos receptores se ha determinado que poseen un 36% de semejanza entre ellos (Menke y col, 1994). Estos receptores son expresados por varios tipos celulares y su activación gatilla los principales sistemas de segundos mensajeros (Kozic, y col, 1998). La activación de fosfolipasa C genera inositol 1,4,5 tri-fosfato y diacilglicerol como segundos mensajeros, que son los mecanismos más comunes de la señal de transducción mediada por receptores de cininas. Posteriormente cambios temporales en los niveles de Ca^{2+} y la activación de proteína quinasa C, son los primeros estímulos para cambios a corto y a largo plazo en la función celular que implican secreción y mitogénesis. Se ha determinado, que en general, la activación de estos receptores por sus ligandos específicos estaría modulando una amplia gama de procesos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, determinándose su implicancia en el funcionamiento del sistema cardiovascular, en procesos inflamatorios, diferenciación y proliferación celular en diversos tipos celulares, en humanos como también de animales de experimentación (Howl y Payne, 2003).

2.2.1 Receptor B1

Los receptores B1 de cininas pueden ser distinguidos de los receptores B2 por su selectiva y exclusiva sensibilidad a DBK y LDBK, péptidos que carecen de la Arg⁹ en el extremo C-terminal. Se ha determinado que las células humanas y de conejo tienen una mayor afinidad por

LDBK que por DBK (Gobeil y col, 1997). Diversas opiniones indican que el receptor B1 es inducible, esto significa que bajo condiciones normales sólo existe una expresión mínima de este receptor, que generalmente no es suficiente para inducir los mecanismos de señalización intracelular. Se sobre-expresa en procesos inflamatorios, especialmente cuando aumentan los niveles de IL-1 β o existe presencia de lipopolisacáridos bacterianos (Bhoola y col, 1992). Una sobre-expresión similar se ha observado cuando se generan situaciones de stress como en el caso de cultivos celulares primarios o se mantienen tejidos aislados por tiempo prolongado (Regoli y Barabe, 1980). La sobre-expresión de este receptor es una característica inusual en receptores acoplados a proteína G. Las cininas también pueden inducir la expresión del receptor B1, específicamente en fibroblastos de pulmón (Phagoo y col, 1999) por un mecanismo que implica la liberación de citoquinas. Sin embargo, no está claro si la inducción del receptor B1 por las cininas es un fenómeno expandido con relevancia fisiopatológica.

La clonación del receptor a partir de fibroblastos humanos embrionarios (células IMR-90) permitió determinar que éste correspondía a una proteína de 353 aminoácidos (Menke y col, 1994). Del mismo modo se observó que LDBK se une con mucha mayor afinidad que DBK al receptor expresado por estas células. Se ha sugerido que el residuo N-terminal de LDBK proporcionaría la fuerza de unión a través de un contacto específico con los cuatro dominios extracelulares del receptor (Fathy y col, 2000).

2.2.2 Receptor B2

A diferencia del receptor B1, este receptor es expresado constitutivamente por varios tipos celulares entre los que se incluyen las células del tubo colector y asa de Henle en el riñón, células musculares lisas vasculares, el conducto deferente, intestino delgado, árbol respiratorio,

fibroblastos epidérmicos y queratinocitos (Figuroa y Müller-Esterl, 1998). El receptor B2 es activado por las cininas que contienen la secuencia completa del péptido, es decir por LBK y BK, así también como por sus formas hidroxiladas Hyp³-BK y Hyp³-Lys-BK (Dengler y col, 1990).

Mediante autorradiografía se ha revelado la presencia de este receptor en la piel, específicamente en la epidermis y predominantemente en el estrato basal. También se ha confirmado su presencia determinando la expresión de su RNA mensajero (Schremmer-Danninger, 1999). Ensayos utilizando anticuerpos generados contra diferentes dominios del receptor B2 muestran la presencia de la proteína inmunorreactiva tanto en el estrato basal como suprabasal de la epidermis humana (Figuroa y Müller-Esterl, 1998) y en células epidérmicas en cultivo (Vidal y col, 2004).

2.3 PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

La regulación de la proliferación y diferenciación celular, es el resultado de la interacción entre programas endógenos de expresión génica y señales externas proporcionadas por hormonas, factores de crecimiento, y por contactos célula-célula. La integración de estas señales determina que la célula prolifere, se diferencie o sufra apoptosis, entre otros procesos.

Por técnicas tales como western blotting se ha determinado que la activación de receptores tanto B1 y B2 de cininas por sus respectivos agonistas estaría activando una vía dependiente de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que corresponden al grupo de serina-treonina quinasas que son rápidamente activadas en respuesta a la estimulación con factores de crecimiento y/o diferenciación. Existiendo evidencia del rol que tendría esta vía en procesos de diferenciación y proliferación celular.

La epidermis se renueva constantemente, y puede cambiar su tasa de renovación en respuesta a estímulos externos. La capa proliferante en la epidermis es el estrato basal, en que se encuentran una variedad de subtipos de células basales: células madre, células amplificadoras transitorias y células en proceso de diferenciación (Fairley y Zivony, 2001). Las primeras sólo comprenden el 10% del total de células de este estrato; estas células ciclan lentamente y pueden originar a otras células madre o al segundo tipo celular (células amplificadoras transitorias), estas últimas conforman casi el 50% de la capa basal, y sólo son capaces de dividirse unas pocas veces antes de entrar al proceso de diferenciación, se ha determinado que esto se logra en cuatro divisiones, desde célula madre hasta una célula en diferenciación (Potten, 1974).

2.3.1 Ciclo celular en las células epidérmicas

Con excepción de la epidermis y algunas otras células, estas no entran en división a menos que reciban señales extracelulares que las activen. Las señales que inducen a las células a dividirse pueden ser factores de crecimiento, citoquinas o mitógenos todos los cuales gatillan cascadas de transducción que finalizan en la replicación del DNA. Las células que no están continuamente en el ciclo permanecen en G_0 (estado de reposo). El ciclo celular se divide en varias fases o etapas conocidas como: G_1 , S, G_2 y M. En queratinocitos humanos se ha visto que la duración de G_1 es de 10 a 400 h, aunque este tiempo disminuye en estados de cicatrización, donde se requiere una alta tasa de proliferación. En esta fase existe un punto de restricción, en el cual la célula “decide” si avanza o no en el proceso. Posteriormente la célula entra a la fase S, donde ocurre la replicación del DNA, la duración de esta fase es entre 8 y 12 h. En G_2 , fase de aproximadamente 8 h, la célula continúa creciendo; en esta fase se da un segundo punto de restricción, en el que se chequea el resultado de la síntesis de DNA antes que la célula comience

la mitosis. La mitosis es la fase más corta, sólo toma de 1 a 2 h y es donde ocurre la división del citoplasma para la formación de dos células hijas. Completada la mitosis, la célula puede retomar G_1 , salir definitivamente del ciclo y diferenciarse, o salir temporalmente y quedarse en G_0 . Las células que se encuentran en G_0 pueden posteriormente entrar nuevamente en el ciclo, especialmente ante la aparición de heridas y la generación de factores de crecimiento. Se ha calculado que en la epidermis normal un 30-40 % del total de las células corresponden a células en G_0 , mientras que en desordenes tales como psoriasis en que existe una hiperplasia exagerada, este porcentaje puede llegar a 0%.(Weinstein y col, 1985).

2.3.2 Métodos para determinar proliferación celular *in vitro*

Durante la proliferación celular, el DNA que ha sido replicado se divide en dos células hijas. Esta cercana asociación entre síntesis de DNA y replicación celular, hace muy atractiva la medición de la síntesis de DNA para determinar proliferación celular. Tradicionalmente se han usado nucleósidos radiomarcados, particularmente timidina tritiada [^3H]- TdR, la que es incorporada al DNA y cuantificada por medición de la radioactividad emitida. El análogo de timidina, 5-bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) es incorporado al DNA como timidina, que puede ser subsecuentemente detectado por inmunocitoquímica, citometría de flujo, ELISA, usando anticuerpos monoclonales contra BrdU.

Las poblaciones celulares, también pueden ser analizadas mediante western blotting pesquizando antígenos asociados al ciclo celular, donde se puede comparar la intensidad de las bandas de proteínas expresadas luego del estímulo y así estimar la proliferación celular en forma indirecta semi-cuantitativa.

2.3.3 Diferenciación de las células epidérmicas

El proceso de diferenciación en queratinocitos es esencial para la función de la epidermis. Este está asociado con cambios en la expresión génica, especialmente en genes que codifican proteínas llamadas queratinas, que son las proteínas más abundantes de las células epidérmicas. La epidermis está formada por 10-20 capas de queratinocitos y durante el ciclo de diferenciación normal se distinguen cuatro estadios: basal, espinoso, granular y cornificado (Eckert, 1989; Fuchs, 1990; Blumenberg, 1994). Las células basales se caracterizan por su actividad mitótica y la expresión de ciertos tipos de queratinas (CK5 y CK14). En respuesta a estímulos no bien establecidos aún, estas células son llevadas a la diferenciación terminal, proceso que se inicia con su separación de la membrana basal; donde se detiene la proliferación y se transforman en células del estrato espinoso. Luego inician su ascenso y maduración a través de la región suprabasal expresando los primeros marcadores de diferenciación terminal, queratinas CK1 y CK10 (Fuchs col., 1980; Roop y col, 1988). Estos marcadores son expresados tanto en la capa espinosa como granular. En la capa granular se expresan precursores de la cubierta cornificada tales como (pro)filagrina, loricrina, involucrina y transglutaminasa (Simon y Grenn, 1984)(Fig. 2). Los estados finales del proceso de diferenciación se llevan a cabo después de la disolución del núcleo y organelos con la formación de cubiertas cornificadas que son ensambladas en un estrato córneo metabólicamente inerte. Una imagen esquemática de los estratos de la piel se presenta en la Fig. 2

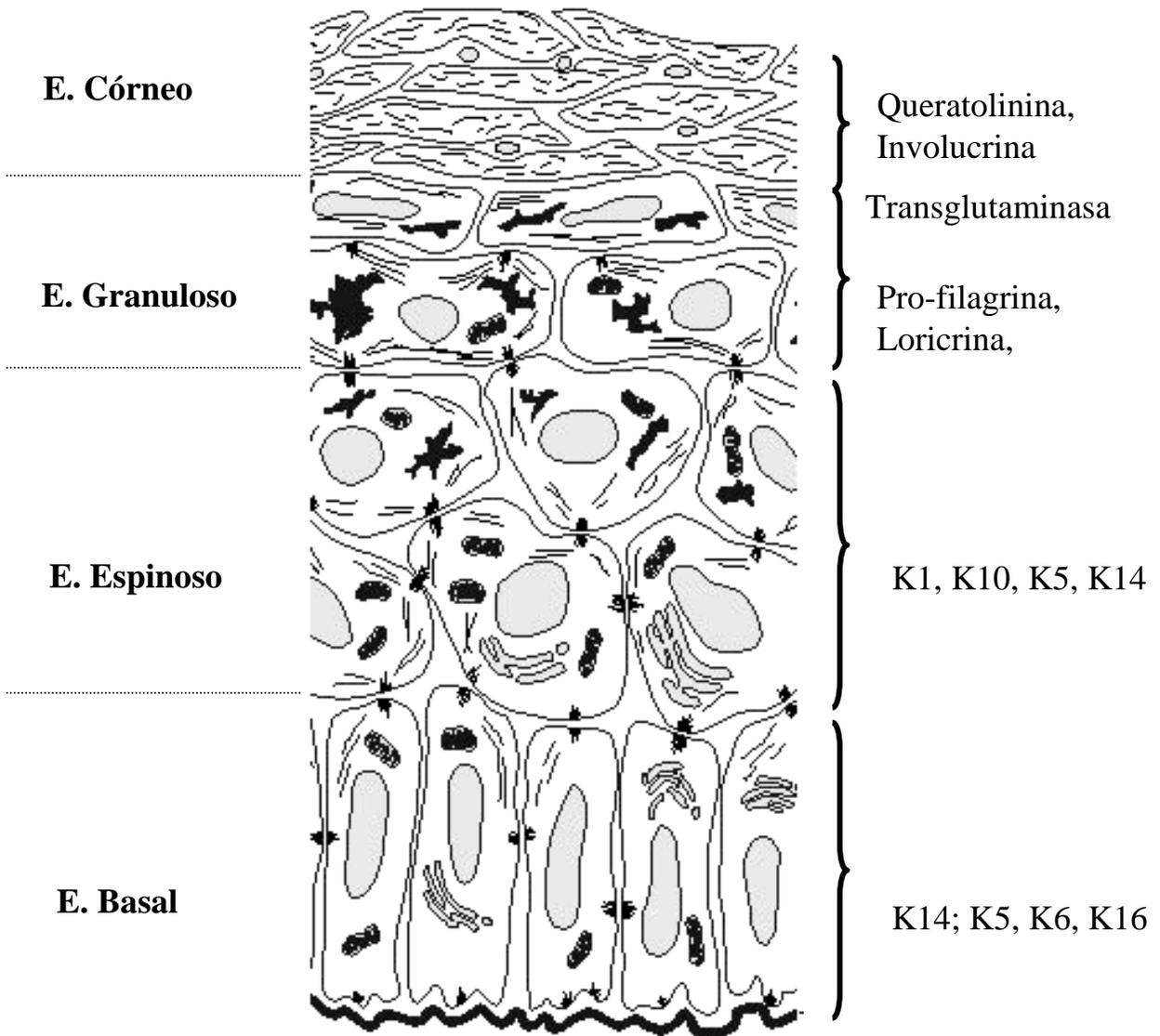


Figura 2. Representación esquemática de los estados de diferenciación del queratinocito, con las proteínas específicas de cada uno de los estados (marcadores).

2.4 Objetivos

Los objetivos del presente trabajo tesis fueron: 1) Determinar mediante inmunocitoquímica, la expresión de receptores B1 y B2 de cininas en células epidérmicas humanas. 2) Comparar de la acción de los agonistas B1 y B2 sobre la proliferación de células epidérmicas en cultivo, midiendo la incorporación de BrdU. 3) Comparar la diferenciación inducida por agonistas B1 y B2 mediante inmunocitoquímica, pesquizando proteínas claves en la diferenciación del queratinocito.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 EQUIPOS

Cámara de flujo laminar Factomet; pHmetro WTW pH 521; Estufa de cultivo Memmert; Baño termostático Haake E 12; Pipeteador automático Drummond; Centrífuga de aceleración programable Sigma 4K-10; Microcentrífuga Biofuge 15 Heraeus; Vortex Scientific Instruments; Microscopio invertido Nikon; Cámara Neubauer Hawksley; Microscopio óptico Zeiss; Balanza analítica electrónica Precisa 120; Agitador magnético termostático Cole-Parmer Instruments; Horno de microondas Samsung; lector de ELISA Metertech Σ 960.

3.2 REACTIVOS

3.2.1 Medios de cultivo

Los cultivos de queratinocitos se mantuvieron en medio definido para queratinocitos libre de suero con $< 0,1$ mM de Ca^{+2} (DK-SFM, Gibco BRL, Life Technologies) suplementado con factores de crecimiento, antibióticos y antimicóticos.

Las células provenientes de la línea celular GMEL (células derivadas de melanoma) se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal de bovino antibióticos y antimicóticos (GIBCO BRL, Life Technologies).

3.2.2 Péptidos y proteínas

Para la estimulación de los receptores B1 y B2 de queratinocitos, se utilizaron los siguientes péptidos: lisina-bradicinina (LBK), lisina-des-[Arg⁹]-bradicinina (LDBK), y

bradicinina 1-5 (BK1-5) un péptido de degradación de bradicinina (Bachem Torrance, CA USA). Como control positivo de todos los ensayos de proliferación se utilizó factor de crecimiento epidérmico (EGF; Sigma Aldrich, USA).

Para inducir la sobre-expresión del receptor B1 de cininas se utilizó IL-1 β (Calbiochem, La Jolla, CA) en presencia y ausencia del inhibidor de prostaglandinas, diclofenaco sódico (Sigma).

3.2.3 Anticuerpos

Para detectar las células en fase S del ciclo celular se empleó BrdU y un anticuerpo monoclonal que fue generado utilizando BrdU conjugada a albúmina de bovino (mAb G3G4; Developmental Studies Hybridoma Bank, Baltimore, MD). Para la detección de citoqueratina 10 (CK10) se usó el anticuerpo monoclonal anti-CK10; Dako, CA USA), y para (pro)filagrina se empleó el anticuerpo monoclonal anti-(pro)filagrina (Biomedical Technologies Inc, Stoughton MA, USA). Cuando se determinó la proliferación de las células epidérmicas mediante test de ELISA, se usó un anticuerpo anti-BrdU conjugado a peroxidasa proporcionado con el kit. (Roche, Alemania).

3.3 CULTIVOS CELULARES

3.3.1 Cultivo de queratinocitos humanos

Se aislaron células epidérmicas humanas de donantes sanos sometidos a cirugía plástica. La piel se desgraso y se guardó durante la noche a 4°C en solución salina altamente balanceada (HBSS)(GIBCO BRL, Life Technologies) sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, suplementado con antibióticos. Mediante la ayuda de un querátomo se obtuvieron laminas de piel, conteniendo epidermis y

dermis, de aproximadamente 1 mm de espesor. El uso de tripsina 0,05% en HBSS por 60 min a 37°C permitió separar la epidermis de la dermis. Posteriormente, la epidermis se disgregó con ayuda de tijeras y pipeteo repetido obteniéndose una suspensión celular que luego se filtró a través de gasa estéril y se lavó con HBSS suplementado con SFB al 10%. Por último las células se contaron y se determinó su viabilidad mediante exclusión en azul tripano al 0,05% (Sigma).

Alrededor de 10^6 queratinocitos se cultivaron en igual proporción con fibroblastos 3T3 de ratón previamente tratados con mitomicina C 5 $\mu\text{g/ml}$ para impedir su replicación. El cultivo se realizó en una mezcla 3:1 de DMEM y medio *Ham's* F-12 suplementado con SFB 10%, hidrocortisona 0,4 $\mu\text{g/ml}$, insulina 5 $\mu\text{g/ml}$, toxina del cólera 10^{-10} M, EGF 10 $\mu\text{g/ml}$, penicilina-estreptomicina (penicilina G sódica 10.000 U/ml y sulfato de estreptomicina 10.000 $\mu\text{g/ml}$ y fungizone[®] (anfotericina B 250 $\mu\text{g/ml}$ y deoxicolato de sodio 205 $\mu\text{g/ml}$). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5 % hasta que alcanzaron la subconfluencia. Luego, los queratinocitos fueron tratados con tripsina al 0.25 % y EDTA 1 mM y resembrados en el mismo medio y de la misma forma. Después de dos o tres pasajes, las células fueron resuspendidas en *Cell Culture Freezing Medium-DMSO*[®] a una concentración de $5 \cdot 10^6$ células/ml, congeladas y mantenidas en nitrógeno líquido hasta su utilización.

De las células almacenadas en nitrógeno líquido, se extrajeron viales que contenían un número adecuado de células, éstas se descongelaron en un baño termostático (37°C) y se les agregó 500 μl de SFB a fin de contrarrestar la toxicidad del medio de congelación. Seguidamente se lavó tres veces en HBSS-SFB en una proporción 10/1 para eliminar cualquier residuo del medio de congelación, centrifugando a 1700 rpm después de cada lavado. El pellet se resuspendió en medio de cultivo DK-SFM y se determinó el número aproximado de células, y su viabilidad mediante exclusión en azul tripano. Se sembraron células en portaobjetos de ocho

pocillos cuando se deseaba realizar inmunocitoquímica, o en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, USA) para determinar mediante ELISA el efecto de cininas y EGF sobre la proliferación celular. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en un ambiente de 5% CO₂ en DK-SFM hasta que alcanzaron un 60–70% de confluencia. En todos los experimentos excepto cuando se especifique, después de alcanzar la confluencia deseada, se procedió a retirar el medio de cultivo y lavar las células con HBSS y a cultivar por 48 h adicionales en DK-SFM sin factores de crecimiento. Posterior a esto, se procedió a estimular con diversos agonistas por los tiempos y concentraciones que serán especificadas en la descripción de cada experimento.

3.4 MÉTODO COLORIMETRICO PARA DETERMINAR PROLIFERACIÓN CELULAR

3.4.1 Características generales de la técnica

Este método colorimétrico es una alternativa no radioactiva para la cuantificación de proliferación celular basado en la medición de la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de timina en células proliferantes durante la fase S del ciclo celular. Este compuesto es detectado posteriormente mediante un anticuerpo unido a peroxidasa, y el complejo inmune formado es subsecuentemente revelado mediante una reacción colorimétrica con el sustrato tetrametil-benzidina. El color desarrollado se cuantifica midiendo la absorbancia a una longitud de onda fija de 450 nm en un lector de ELISA. Este es un método cuantitativo para determinar proliferación celular, donde la relación entre absorbancia, y cantidad de DNA sintetizado es directamente proporcional.

3.4.2 Sincronización celular e incorporación de BrdU

Una vez despertadas y cultivadas de acuerdo al protocolo descrito anteriormente (punto 3.3.1) Se estimularon como se detallará en cada experimento, 24 h antes de concluir éste, se adicionó BrdU 100 μ M, de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor del kit. Posteriormente se elimina el medio de todos los pocillos con ayuda de una pipeta multicanal y se dejó secar a temperatura ambiente.

3.4.3 Fijación y denaturación

La fijación de las células y la denaturación del DNA son pasos necesarios para lograr una exposición adecuada de la BrdU incorporada en el núcleo, así como una accesibilidad óptima del anticuerpo a la BrdU. De acuerdo a las indicaciones del proveedor, una vez eliminado el medio las células son fijadas, y el DNA denaturado, incubando las células durante 1 h en el reactivo comercial (etanol). Completado este tiempo se elimina la solución por inversión de la placa y se deja secar a temperatura ambiente.

3.4.4 Detección y cuantificación de la coloración

Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado a peroxidasa que se diluyó 1/100 con la solución buffer proporcionada en el kit. De la mezcla de anticuerpo diluída se agregaron 100 μ l por pocillo y se incubó por 90 min a 20° C. Para eliminar todo vestigio de anticuerpo no unido, se realizaron 4 lavados de 10 min cada uno con buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente, se agregaron 100 μ l/pocillo de solución reveladora (tetra-metilbenzidina) y se incubó por 25 min. Concluido este tiempo se adicionaron 25 μ l de ácido sulfúrico concentrado por pocillo con el fin de detener la reacción.

Finalmente, se determinó la absorbancia del color producido por la reacción enzima-sustrato, a una longitud de onda fija de 450 nm utilizando un lector de ELISA.

3.5 EFECTO DE AGONISTAS DE RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPIDÉRMICAS EN CULTIVO

3.5.1 Efecto de la concentración de los agonistas

A fin de determinar si la proliferación de queratinocitos es modulada por la activación de receptores B1 y/o B2 de cininas se utilizó el protocolo antes descrito y estimulando los cultivos celulares por 48 h (dos estimulaciones con la misma concentración del agonista) con diferentes concentraciones de cada agonista. Se utilizaron los péptidos LDBK y BK1-5, agonistas del receptor B1 y LBK agonista del receptor B2.. Las concentraciones de agonistas utilizadas fueron 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000 nM. Como control de todos los experimentos se utilizó EGF, conocido por sus efectos sobre la proliferación y diferenciación de las células epidérmicas. Como control negativo de cada experimento se incubó las células con medio de cultivo sin factores de crecimiento. Además, se incluyó otro control destinado a evaluar la posible unión inespecífica del anticuerpo anti-BrdU, pero usando células que no fueron tratadas con BrdU. Luego de la estimulación y exposición a BrdU se prosiguió con el método ya descrito para evaluar el efecto de estos péptidos sobre la proliferación.

3.5.2 Efecto del pre-tratamiento con IL-1 β en la respuesta de los queratinocitos a los agonistas de receptores B1 y B2

Después de cultivar y sincronizar las células fueron tratadas por 12 h con IL-1 β a una concentración de 1 ng/ml, se realizaron 2 lavados en HBSS estéril y luego se estimuló por 48 h con LDBK, BK1-5, y LBK en concentraciones de 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000 nM. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada 24 h. Una vez finalizado éste, se procedió a determinar la proliferación celular mediante el test de ELISA. En este ensayo se usó como control negativo a células no estimuladas en incubadas con medio de cultivo basal (sin factores de crecimiento) y a células no estimuladas, pero tratadas con IL-1 β a la misma concentración.

3.5.3 Efecto del tratamiento con diclofenaco sódico

Después de cultivar las células y sincronizarlas se trató por 12 h con IL-1 β a una concentración de 1 ng/ml. Seguidamente se realizaron 2 lavados en HBSS estéril y luego se estimuló durante 48 h con los distintos agonistas a las concentraciones señaladas anteriormente en medio base suplementado con diclofenaco sódico 500 nM. El medio se reemplazó por medio fresco cada 24 h. El experimento se continuó con el método ya descrito para evaluar el efecto de estos péptidos sobre la proliferación. Se usó como control negativo células en medio de cultivo basal, células en medio basal con IL-1 β (1 ng/ml) y células en medio basal con IL-1 β (1 ng/ml) y diclofenaco 500 nM.

3.5.4 Efecto de agonistas de los receptores B1 y B2 de cininas sobre la proliferación inducida por EGF

Con el fin de determinar el efecto que tendrían los agonistas de los receptores B1 y B2 de cininas sobre la proliferación inducida por EGF se procedió a estimular los cultivos celulares durante 48 h con LDBK, BK1-5 y LBK en concentraciones de 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000 nM, en medio base conteniendo EGF 10 nM. El ensayo se continuó con el método ya descrito para evaluar el efecto de estos péptidos sobre la proliferación. Como controles negativos se utilizó medio de cultivo basal y otros ya descritos para ver la unión inespecífica del anticuerpo. Como control positivo se trataron células bajo las mismas condiciones sólo con EGF 10 nM.

3.6 EFECTO DE AGONISTAS DE RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CELULAS EPIDERMICAS EN CULTIVO

Las células cultivadas y sincronizadas (24 h sin factores de crecimiento) como ya fue descrito fueron estimulados directamente con una dosis de LDBK, BK1-5 y LBK a una concentración de 1 μ M por 12 h, o fueron previamente tratadas con IL-1 β 1 ng/ml por 12 h. En ambos esquemas de trabajo se procedió a secar las células al aire una vez terminado el experimento. Posteriormente para evaluar el grado de diferenciación inducido por los agonistas se procedió a determinar, utilizando inmunocitoquímica la expresión de los siguientes marcadores: citoqueratina 10 (CK10), proteína representativa de la capa espinosa, y (pro)filagrina, un marcador de diferenciación terminal del queratinocito. La expresión de ambos marcadores se determinó usando anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos unidos se detectaron utilizando el

kit LSAB+/peroxidasa (Dako, USA) y la peroxidasa fue visualizada usando el cromógeno aminoetilcarbazol (ver 3.7).

3.7 INMUNOCITOQUÍMICA

3.7.1 Anticuerpos

Se usaron los anticuerpos que a continuación se indican: a) Anticuerpos anti-secuencias peptídicas de los receptores B1 (Hess y col, 1996) y B2 (Figuroa y col, 1995) de cininas. El anticuerpo anti-receptor B1 se usó a una dilución de 1:400 mientras que el anti-receptor B2 se usó a 1:5000; b) Anticuerpo monoclonal producido contra el complejo BrdU-BSA (1:1000); c) anti-citoqueratina 10 (CK10; 1:1000) y anti-(pro)filagrina (1:500) para evaluar la diferenciación celular experimentada por los queratinocitos estimulados con los diferentes agonistas.

3.7.2 Incorporación y detección de BrdU

En primer lugar se procedió a la estandarización del método utilizado. Como células control con una alta tasa de proliferación se usó la línea celular GMEL producida a partir de melanoma humano. Estas células fueron especialmente útiles para comenzar a trabajar con este método dado que se requieren de tiempos muy cortos para su cultivo y para que incorporen la BrdU (3 h). Para optimizar la técnica se usó BrdU en distintas concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 μ M en medio completo (con SFB al 10%). Como control se mantuvieron células en medio base (sin SFB) con BrdU en las mismas concentraciones mencionadas anteriormente. Pasadas 3, 6, 12 y 24 h se removió el medio, se lavaron las células en PBS y se fijaron en una mezcla de etanol al 80% y ácido acético concentrado en una

proporción de 10:1. Para detectar la BrdU incorporada en el núcleo fue necesario exponer los sitios antigénicos mediante tratamiento con microondas a 90°C por 10 min. utilizando buffer citrato a pH 6,0. Luego se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ 0,3% en PBS por 10 minutos y se trató con tritón-X 100 al 0,1% en PBS por 10 min. La presencia de BrdU se detectó usando un anticuerpo monoclonal anti-BrdU en PBS-0,5% BSA diluido a 1/500, 1/1000, 1/2000 y 1/5000 e incubando durante toda la noche. Entre cada incubación se lavó 3 veces por 5 min cada vez con PBS pH 7.4.

Una vez establecidas las condiciones para visualizar la BrdU incorporada, mediante inmunocitoquímica, se procedió a aplicar un método similar a las células epidérmicas en cultivo. Sin embargo, debido a que la proliferación de estas células es mucho menor que la de las células de melanoma, se debió modificar el tiempo de estimulación de las células y el tiempo de incorporación de BrdU (aumentar a 24 h), manteniendo fijos todos los otros parámetros.

3.7.3 Método inmunocitoquímico

Tras todos los procesos propios de cada ensayo se fijó las células físicamente por desecación o químicamente utilizando una mezcla fijadora que contiene para-formaldehído.

Cuando se analizó la expresión de los receptores B1 y B2 de cininas se fijó las células con periodato-lisina-paraformaldehído (PLP) por 20 min. El exceso de fijador se eliminó lavando al menos 3 veces con PBS pH 7,4. Estudios previos han mostrado que este fijador es óptimo para revelar proteínas que se encuentran en la membrana celular. Para determinar la expresión de marcadores de diferenciación celular se prefirió el método de desecación ya que la intensidad de la reacción fue mejor que utilizando fijación química. Una vez desecadas las células fueron permeabilizadas incubando con metanol absoluto a -20°C por 5 min.

La incubación con el primer anticuerpo fue por 3 h (receptores B1 y B2, CK10 y (pro)filagrina) o durante la noche (anti-BrdU). Para detectar los anticuerpos unidos específicamente se usó el kit LSAB+ (Dako) que contiene una mezcla de inmunoglobulinas anti-ratón, cabra y conejo conjugados a biotina y estreptoavidina-peroxidasa. Las células fueron incubadas secuencialmente con la mezcla de anticuerpos biotinilados y con estreptoavidina-peroxidasa por 15 min cada uno. La peroxidasa fue revelada con peróxido de hidrógeno y 3,3' diaminobenzidina por 5 minutos (color café) o AEC (color rojo bermellón). Entre cada una de las incubaciones se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS pH 7.4. Finalmente las células fueron contrastadas con hematoxilina de Harris por 3 min y montadas con el medio acuoso moviol (Polysciences, USA).

3.8 Análisis de Datos y gráficos

A cada una de las lecturas de absorbancias arrojadas por el lector de ELISA se les resta la absorbancia basal (absorbancia dada por las células en ausencia de BrdU), luego se normalizaron los valores de lectura dividiéndolos por la absorbancia en ausencia de estímulo. De esta manera cada valor representa la incorporación sobre el valor obtenido por el cultivo no estimulado. Los valores obtenidos se promediaron, se estimó el error estándar y se llevaron a porcentaje. De esta manera, se graficó la tasa de incorporación de BrdU en función de la concentración de los diversos agonistas. Se realizaron al menos tres ensayos en duplicado para cada experimento. Cuando se estimó necesario, se realizó un test estadístico de significancia, (t-student), donde un valor $P < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 EXPRESIÓN DE RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS EN QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

Mediante el uso de inmunocitoquímica y anticuerpos dirigidos contra secuencias de los dominios intra- y extra-celulares de los receptores B1 y B2, se pudo comprobar la expresión de ambos receptores en cultivos primarios de queratinocitos humanos. Bajo condiciones basales (sin ningún tipo de estímulo), esta técnica permitió observar una intensa reacción para el receptor B2 en prácticamente todas las células (Fig. 3). En contraste la reacción obtenida para el receptor B1 fue menor, apreciándose además la nula expresión de este receptor en algunas células (Fig. 3).

Estos resultados concuerdan con estudios realizados anteriormente donde se ha podido determinar la presencia del receptor B2 en células epidérmicas. Sin embargo, es primera vez que se determina mediante inmunocitoquímica la presencia del receptor B1 en queratinocitos humanos.

4.2 EFECTO DE IL-1 β EN LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS

Diferentes tipos de ensayos han permitido determinar que en condiciones normales, el número de receptores B1 es menor al de receptores B2 (Marceau y col, 1998). Del mismo modo, se ha determinado que el receptor B1 puede ser inducido bajo ciertas condiciones, por ejemplo con IL-1 β . Por lo tanto, es de interés establecer si la sobreexpresión de estos receptores tiene algún efecto en los procesos gatillados por estos mismos.

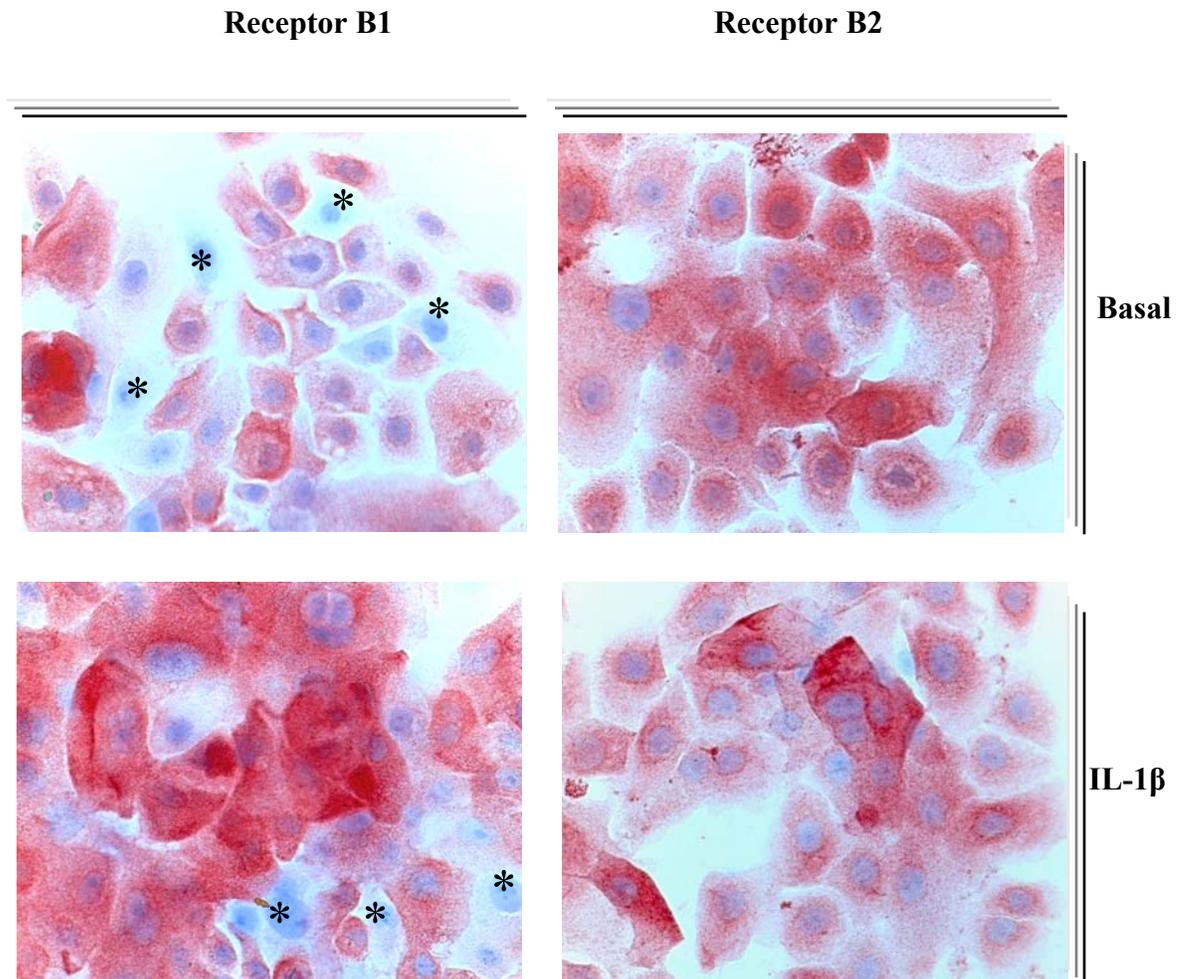


Figura 3. Immunolocalización de receptores B1 y B2 en queratinocitos en cultivo bajo condiciones basales y tratadas con IL-1 β . Los queratinocitos fueron cultivados y luego mantenidos en medio basal por 48 h. Las células de la imagen inferior se trataron por 12 h adicionales con IL-1 β [1 ng/ml]. Se fijó con PLP por 20 min y los receptores fueron detectados utilizando anticuerpos anti-receptor B1 (1/400), y anti-receptor B2 (1/5000).

Al pretratar las células epidérmicas en cultivo con 1 ng/ml de IL-1 β , por 12h, se pudo determinar que esta dosis de la citoquina sobre-expresaba al receptor B1, observándose una mayor intensidad en las células respecto de aquellas no tratadas con IL-1 β (Fig. 3). No obstante, persistieron queratinocitos en los cuales no había expresión del receptor B1, apreciándose una especie de puzzle entre células que expresaban este receptor con gran intensidad y otras que no. De igual manera, se puede inferir que no existe una sobre-expresión significativa del receptor B2, en estas células por IL-1 β , ya que no se apreció mayor diferencia en la intensidad de la reacción, cuando se comparó con los queratinocitos no tratados.

4.3 INCORPORACIÓN DE BRDU EN QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

Mediante inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal contra BrdU-BSA, se pudo comprobar que las células epidérmicas en cultivo internalizan este análogo de timidina y lo incorporan en su DNA (Fig. 4).

Se puede ver que hay menor cantidad de células marcadas, bajo el tratamiento en medio basal, no así en las células cultivadas en DK-SFM + factores de crecimiento, donde existe una abundancia de células marcadas.

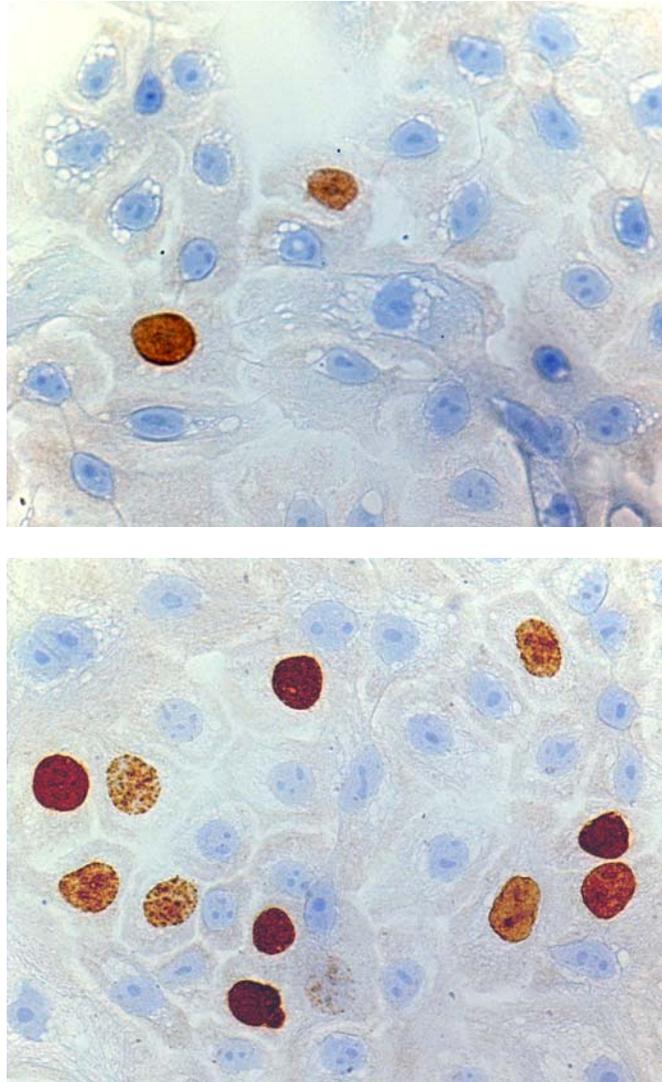


Figura 4. Incorporación de BrdU en células epidérmicas en cultivo. Los queratinocitos fueron cultivados y luego mantenidos en medio basal por 48 h. Las células de la imagen superior se mantuvieron en medio basal mientras las células de la imagen inferior se trataron con medio DK-SFM suplementado con factores de crecimiento por 24 h adicionales. Se fijó con etanol/ácido acético 10/1, y se trató en microondas 10 min. La presencia de BrdU se detectó usando anticuerpos anti-receptor BrdU- BSA (1/1000).

4.4 LOS AGONISTAS DEL RECEPTOR B1, LDBK Y BK1-5 NO INDUCEN LA PROLIFERACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

Mediante la incorporación de BrdU, determinada por ensayos de ELISA, se pudo establecer que la estimulación de los receptores B1 de cininas por LDBK y BK1-5 no resulta en la proliferación de los queratinocitos.

Los cultivos fueron estimulados con concentraciones crecientes de LDBK, BK1-5 y EGF, este último, es un conocido mitógeno que se utilizó como control positivo y que actúa vía unión a su receptor específico (EGFR). Los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de péptidos utilizadas, muestran que ambos agonistas producen un comportamiento similar (Fig. 5). La incorporación de BrdU fue inferior a la observada bajo condiciones basales (sin tratamiento) e independiente de la concentración de LDBK y BK 1-5 utilizada. Cuando se comparó el efecto de estos péptidos con el producido por EGF se pudo determinar que una concentración 10 nM de este factor de crecimiento provocaba un aumento en la incorporación de BrdU que correspondía al doble de la incorporación observada en condiciones basales (Fig.5). Concentraciones más altas de EGF (100 nM) provocaron un efecto similar al producido por EGF 10 nM. En contraste, con LDBK y BK1-5 el máximo de incorporación era de un 50% bajo el nivel basal.

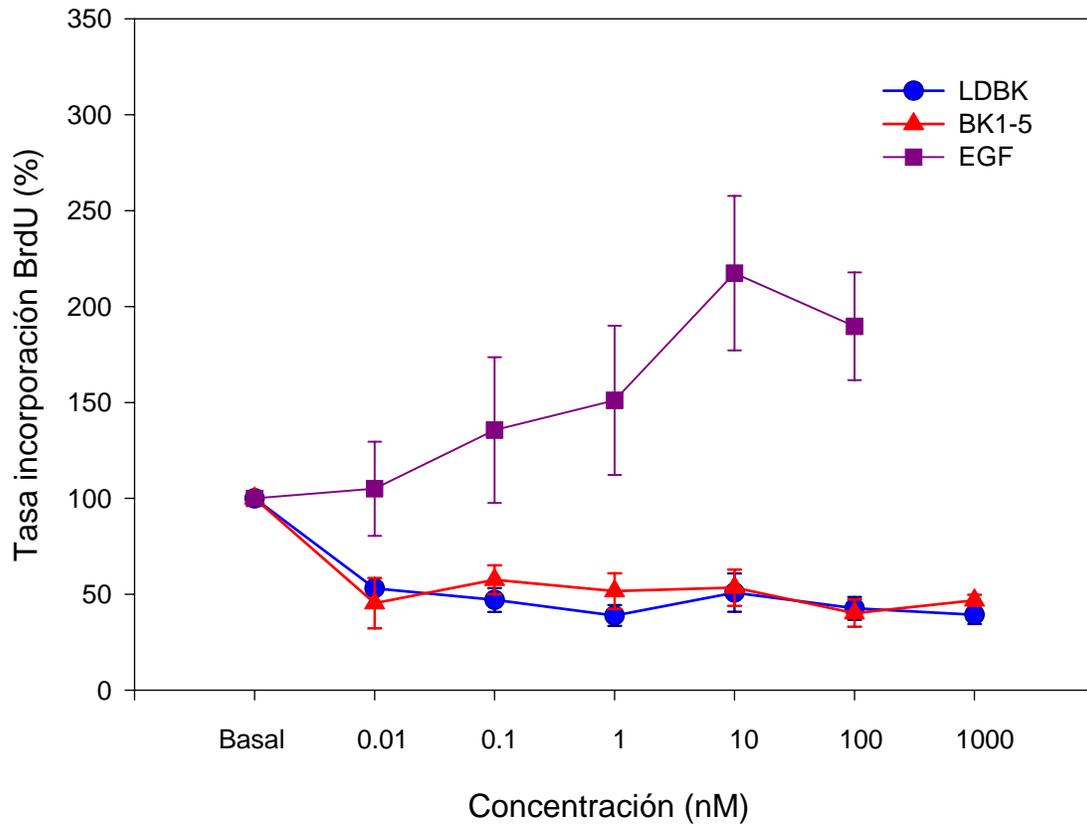


Figura 5. Incorporación de BrdU en queratinocitos en cultivo estimulados con LDBK, BK1-5 o EGF. Los queratinocitos en cultivo se mantuvieron 48 h en medio base, luego se estimuló con distintas dosis de LDBK, BK1-5, o EGF por 48 h; 24 h antes de concluir el experimento se agregó BrdU para estimar la proliferación. La BrdU incorporada al DNA se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado a peroxidasa; el color producido por la peroxidasa fue detectado a 450 nm. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes realizados en duplicado \pm error estándar.

4.5 EL AGONISTA B2, LBK NO INDUCE PROLIFERACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

Para estudiar el efecto de LBK sobre la proliferación se cultivaron queratinocitos y se estimularon con concentraciones crecientes de LBK y se utilizó el mismo método de ELISA, para evaluar proliferación. A fin de tener un patrón de comparación para este péptido, se estimuló las células epidérmicas en paralelo con concentraciones crecientes idénticas de EGF. Similar a lo observado con los agonistas B1, cada una de las concentraciones de LBK utilizadas produjo una incorporación de BrdU inferior a la que exhibían los cultivos carentes de estímulo (Fig. 6). Estos resultados permiten inferir que existiría una inhibición de la proliferación celular causada por este péptido, que sería independiente de la concentración, ya que la variación de la incorporación de BrdU entre éstas no sobrepasa el 30% de diferencia.

4.6 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO CON IL-1 β EN LA RESPUESTA DE LOS QUERATINOCITOS A LOS AGONISTAS DE RECEPTORES B1 Y B2

Debido a la ausencia de proliferación mediada por estimulación de receptores B2 y especialmente B1 de cininas, se quiso comprobar que este proceso no estaba siendo afectado por el pequeño número de receptores B1 expresado por los queratinocitos. Por lo tanto, se realizó un pre-tratamiento con este agente como se detalla en el punto 3.4.7 para luego estimular con los agonistas respectivos.

Tanto las células estimuladas con LDBK como con BK1-5 tienen un comportamiento similar, donde el pre-tratamiento con IL-1 β aumenta en un 20% la incorporación de BrdU. Sin embargo, en ambos casos y como ocurrió al estimular queratinocitos sin pre-tratamiento

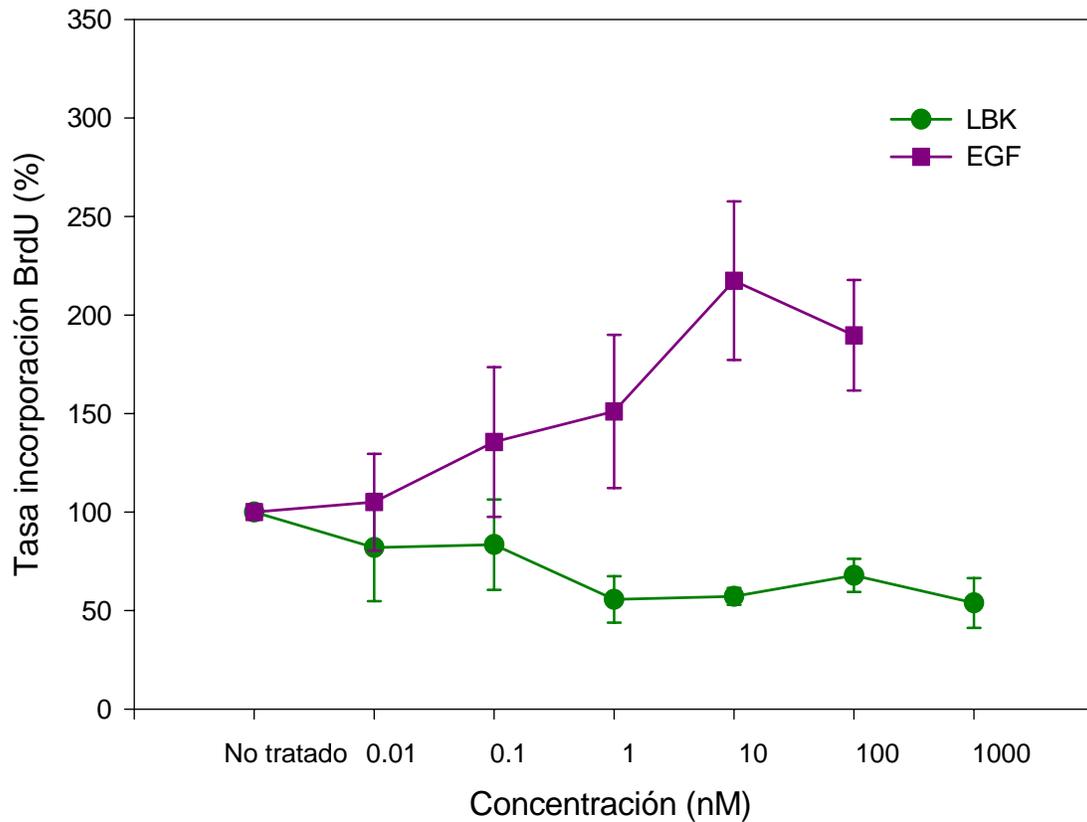


Figura 6. Incorporación de BrdU en queratinocitos en cultivo estimulados con LBK o EGF. Los queratinocitos se mantuvieron 48 h en medio base, luego se estimuló con distintas dosis de LBK o EGF; 24 h antes de concluir el experimento se agregó BrdU que fue posteriormente detectada con un anticuerpo anti-BrdU conjugado a peroxidasa. El color producido por la peroxidasa fue detectado a 450 nm. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes realizados en duplicado \pm error estándar.

con IL-1 β , los valores obtenidos se ubicaron bajo el valor basal (Fig. 7). Se puede inferir nuevamente que los agonistas de tipo B1, LDBK y BK1-5 así como el de tipo B2, LBK no estimularían la proliferación celular, bajo las condiciones experimentales utilizadas. Más aún, el aumento en la concentración de BK1-5 disminuyó progresivamente la incorporación de BrdU en las células pre-tratadas con IL-1 β .

La curva de incorporación de BrdU obtenida luego de estimular las células pre-tratadas con IL-1 β , con el agonista del receptor B2, LBK fue semejante a la exhibida por los agonistas del receptor B1 y muy similar a la obtenida utilizando queratinocitos que no fueron pre-tratados con IL-1 β . Nuevamente y al igual que en los casos anteriores éste valor se encuentra por debajo del basal.

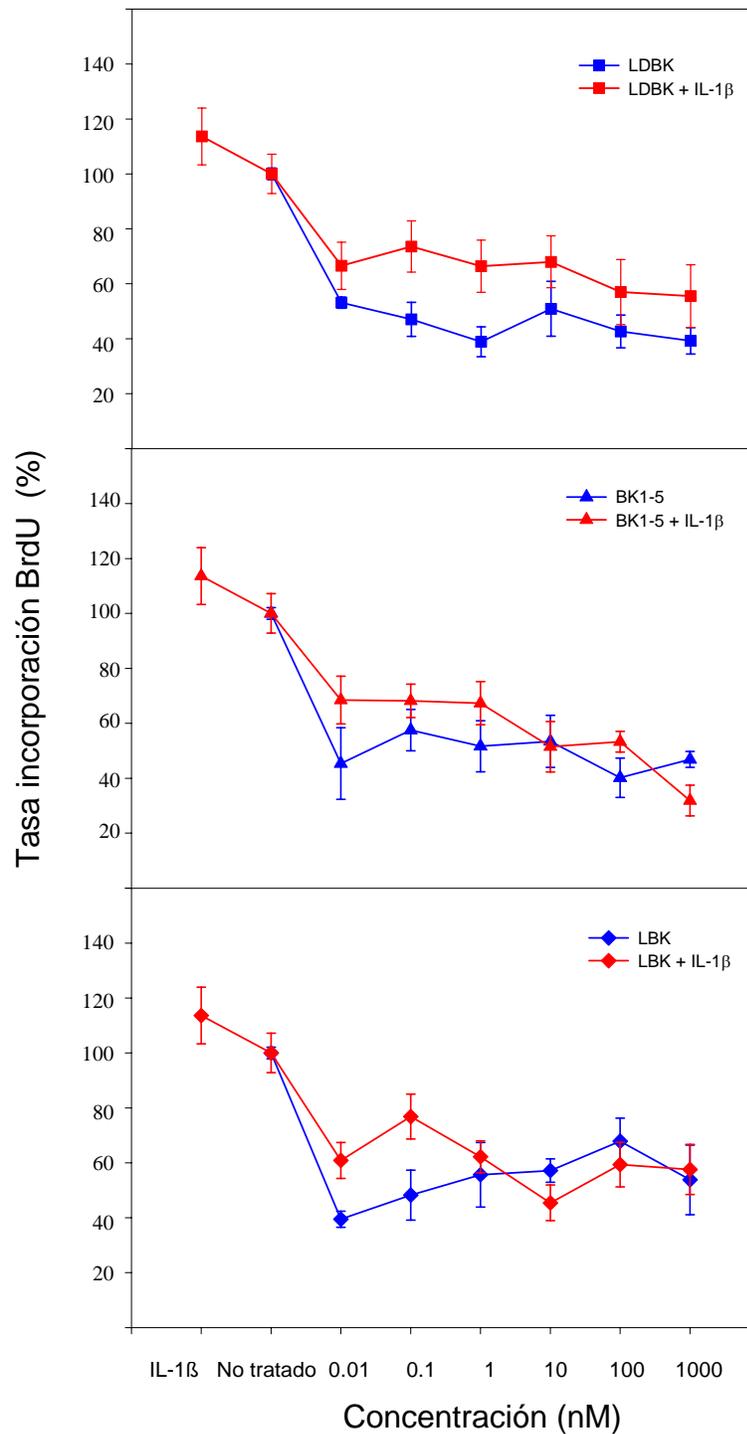


Figura 7. Incorporación de BrdU en queratinocitos en cultivo pretatados con IL-1 β y estimulados con distintas dosis de agonistas B1 o B2. Los queratinocitos se mantuvieron 48 h en medio base, se trató con IL-1 β 1 ng/ml por 12 h y luego se estimuló con distintas dosis de LDBK, BK1-5 o LBK. La incorporación de BrdU fue estimada como se señala en la Fig. 5. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes realizados en duplicado \pm error estándar.

4.7 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO CON IL-1 β Y DICLOFENACO SODICO EN LA RESPUESTA DE LOS QUERATINOCITOS A LOS AGONISTAS DE RECEPTORES B1 Y B2

La síntesis de DNA es una respuesta metabólica a un estímulo que recibe una célula blanco. Esta respuesta puede ser modulada por vías de señalización, incluyendo las gatilladas por productos celulares que actúen en forma autocrina, vale decir elementos producidos en una célula que actúan sobre esta misma. Es así como la sobre-expresión de receptores B1 de cininas inducida por IL-1 β además induce un aumento de prostaglandinas, las que entre otras funciones, inhiben la síntesis de DNA. Por este motivo se utilizó en conjunto con IL-1 β , diclofenaco sódico, un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. Estudios previos realizados en células de músculo liso vascular han mostrado que una dosis de 500 nM es efectiva para inhibir la síntesis de prostaglandinas, por lo tanto en los presentes ensayos se utilizó la misma concentración de la droga.

El efecto antes descrito para esta sustancia se confirmó claramente dado que el tratamiento con IL-1 β indujo una disminución del 10% en la incorporación de BrdU, comparado con el valor basal (células no tratadas). Esta disminución se contrarrestó con el uso de diclofenaco, aumentando la incorporación de BrdU en un 40% en las células tratadas con IL-1 β (Fig. 8). Sin embargo, el uso de este inhibidor no provocó ninguna diferencia en la incorporación de BrdU luego de estimular los queratinocitos con LBK, LDBK y BK 1-5 (Fig. 8).

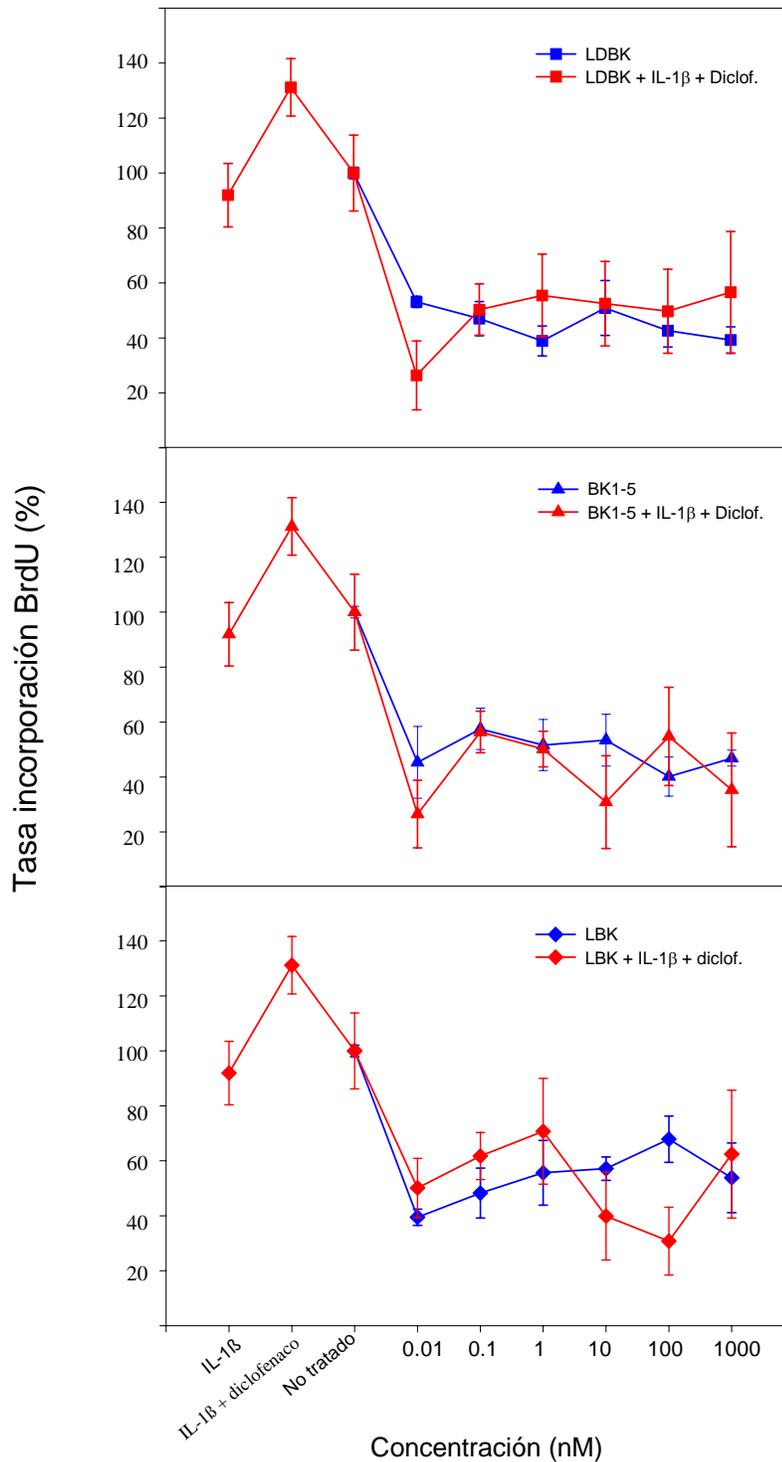


Figura 8. Efecto de IL-1 β y diclofenaco en la incorporación de BrdU por acción de LDBK, BK1-5 o LBK. Los queratinocitos en cultivo se pre-trataron con IL-1 β 1 ng/ml y diclofenaco 500 ng/ml por 12 h, y luego se estimuló con distintas dosis de LDBK, BK1-5 o LBK. La incorporación de BrdU se determinó como se señala en la Fig. 5. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes realizados en duplicado \pm error estandar.

4.8 EFECTO DE LOS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR EGF

Para determinar si la activación de receptores de cininas y de EGF tiene algún grado de *cross-talking*, que a su vez influya en la proliferación de los queratinocitos, se estimularon células con una concentración fija de EGF (10 nM) y concentraciones crecientes de agonistas B1 (LDBK y BK1-5) y B2 (LBK). De esta manera se logró determinar que LDBK 100 y 1000 nM + EGF 10 nM potencian el efecto de EGF aumentando en un 50% la incorporación de BrdU por sobre la incorporación inducida por EGF sólo (Fig. 9)

Un efecto similar, aunque menos relevante, se observó cuando se utilizaron diferentes concentraciones de BK 1-5. No obstante, el aumento de incorporación de BrdU fue similar para todas las concentraciones usadas. En contraste a lo observado con LDBK y BK1-5, LBK indujo un efecto poco claro y no aumentó significativamente la incorporación de BrdU.

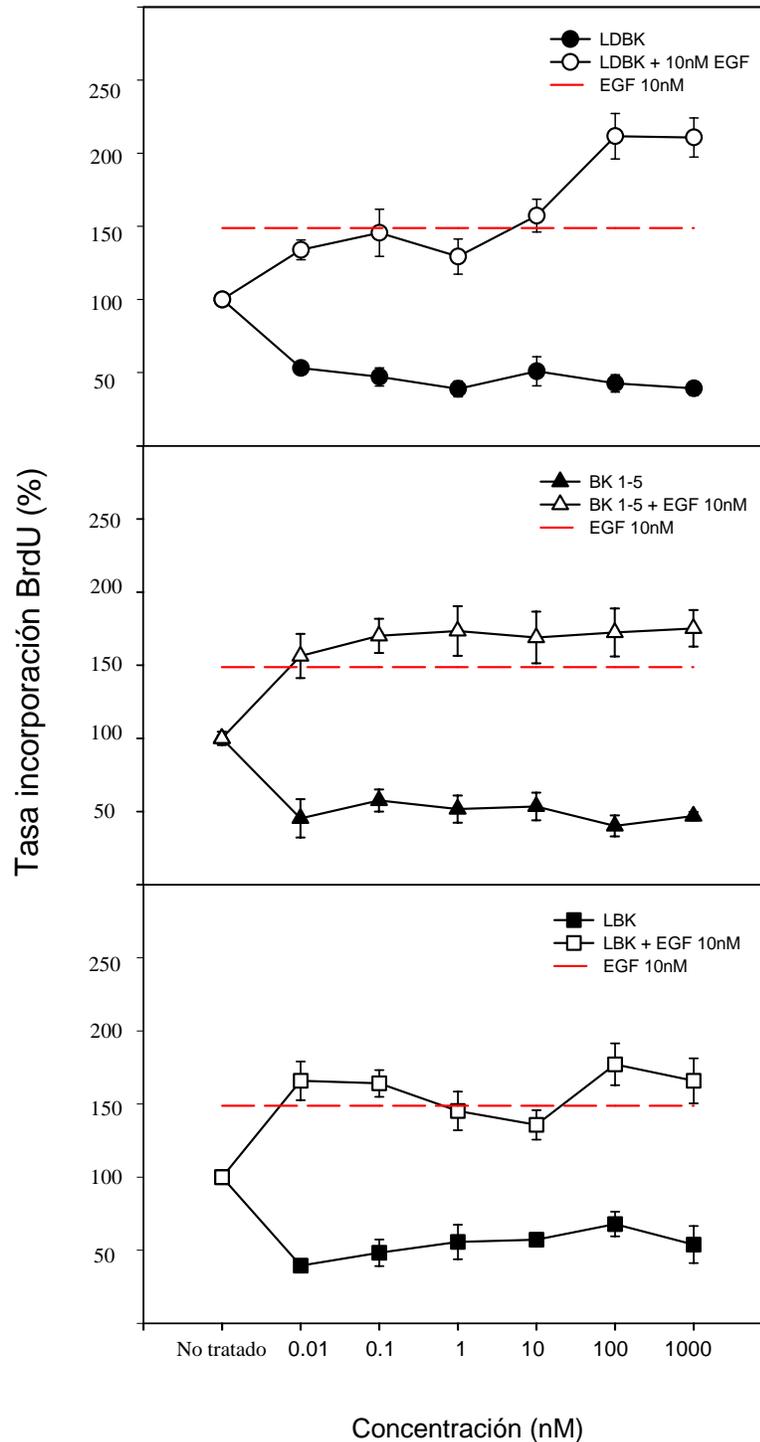


Figura 9. Efecto de agonistas de los receptores B1 y B2 de cininas sobre la incorporación de BrdU inducida por EGF. Los queratinocitos fueron tratados con EGF 10 nM, LDBK, BK1-5, LBK ó bajo la acción conjunta de EGF 10 nM y cada uno de los péptidos. Se determinó la incorporación de BrdU como se señala en la Fig. 5. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes realizados en duplicado \pm error estándar.

4.9 EFECTO DE LBK, LDBK Y BK1-5 SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

Mediante inmunocitoquímica y utilizando anticuerpos específicos contra marcadores de diferenciación tales como las proteínas profilagrina y la citoqueratina 10 se investigó si los agonistas de los receptores B1 (LDBK, BK1-5) y B2 (LBK) estimulaban la diferenciación de los queratinocitos en cultivo, y si el pre-tratamiento con IL-1 β influía de algún modo la acción de estos péptidos. Citoqueratina 10 es sintetizada por queratinocitos que están sufriendo un proceso de diferenciación temprana, mientras que profilagrina es sintetizada por queratinocitos que se encuentran en un proceso de diferenciación avanzada, específicamente por queratinocitos del estrato granular.

4.9.1 Expresión de citoqueratina 10.

Se observó un aumento en la expresión de citoqueratina 10 luego de estimular las células con LDBK y BK1-5. Cuando se comparó el efecto producido por estos péptidos se apreció que las células tratadas con BK1-5, 1 μ M sintetizaban mayores cantidades de citoqueratina 10 que aquellas estimuladas con igual dosis de LDBK (Fig.10). Las células que expresaban citoqueratina 10 inmunorreactiva eran más grandes sugiriendo además por su morfología que estaban en un estado de diferenciación más avanzado. Un hecho interesante fue que el pre-tratamiento de las células en cultivo con IL-1 β por 12 h, produjo un incremento levemente mayor en la expresión de citoqueratina 10 luego de estimular con LDBK y BK1-5.

Por su parte, la estimulación de los queratinocitos con LBK provocó un leve aumento en la expresión de citoqueratina 10 (Fig.11). A su vez el pre-tratamiento con IL-1 β y subsecuente estimulación con LBK no produjo un aumento detectable en la producción de esta proteína.

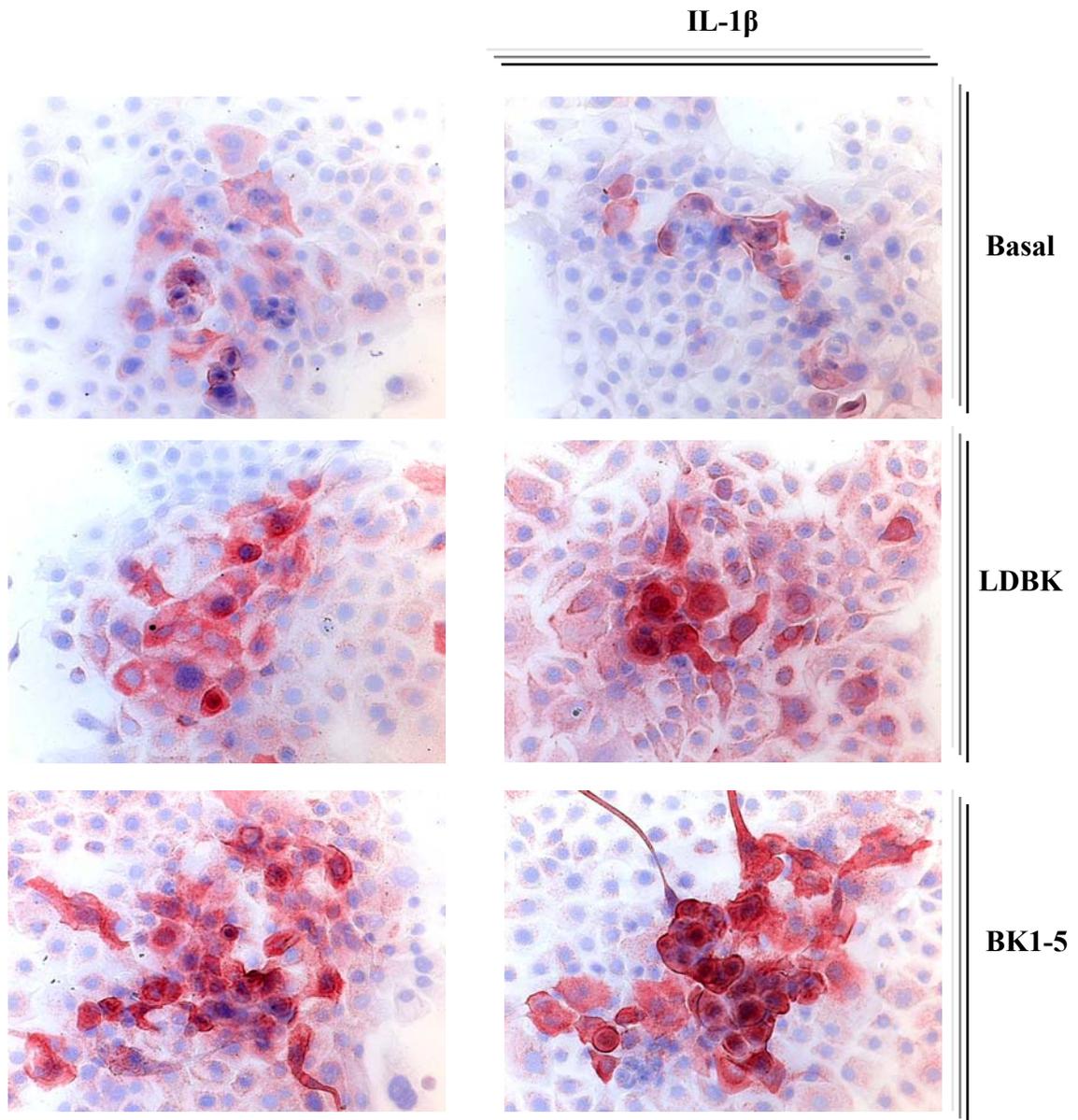
Citoqueratina 10

Figura 10. Expresión de citoqueratina 10 en queratinocitos en cultivo pre-tratados con IL-1 β y estimulados con LDBK ó BK1-5 1 μ M. Los queratinocitos fueron mantenidos en medio basal por 48 h, tratados con IL-1 β por 12 h adicionales y estimulados con cada uno de los agonistas por 12 h. Se detectó la citoqueratina 10 producida con un anticuerpo anti-K10 (1/1000).

Citoqueratina 10

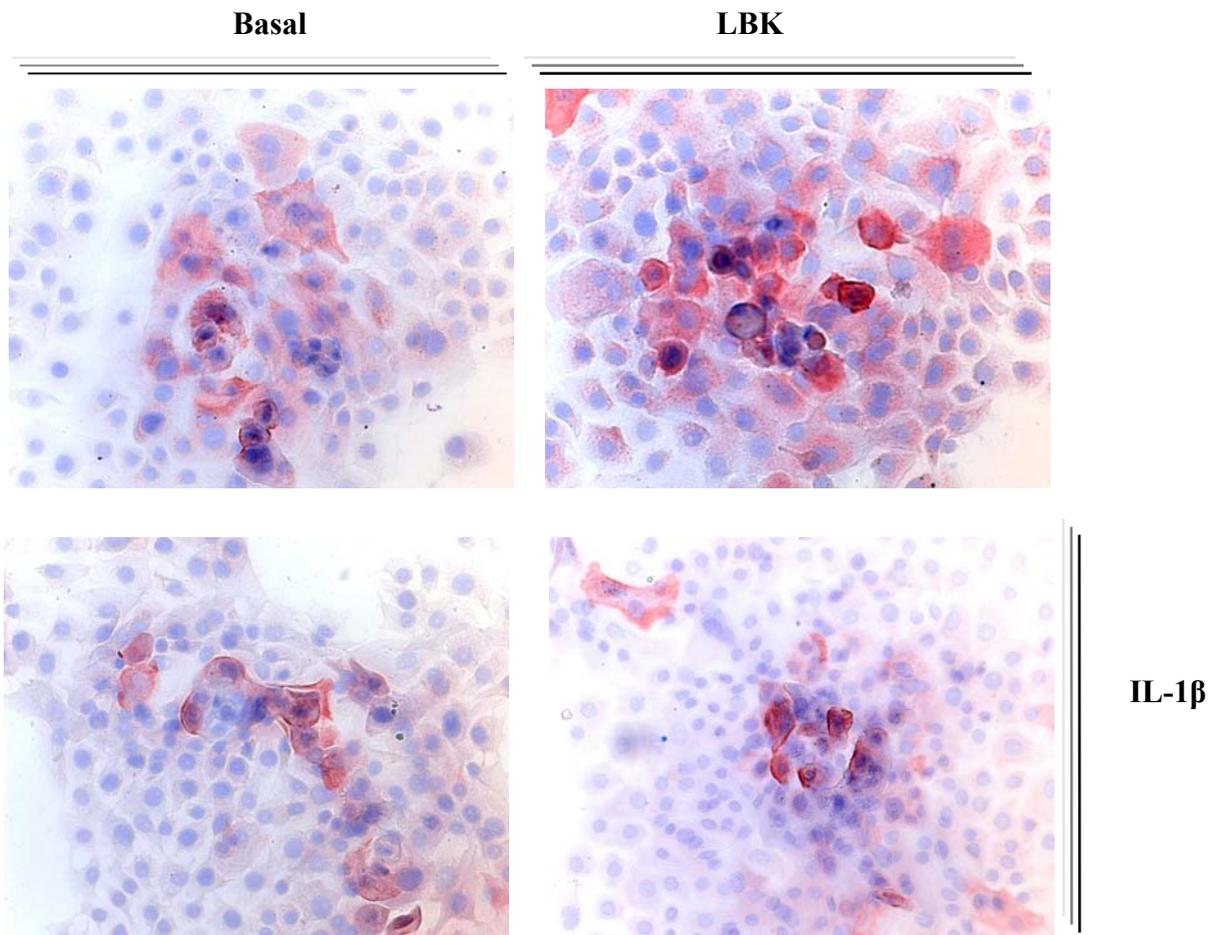


Figura 11. Expresión de citoqueratina 10 en queratinocitos en cultivo pre-tratados con IL-1 β y estimulados con LBK 1 μ M. Los queratinocitos fueron mantenidos en medio basal por 48 h, tratados con IL-1 β por 12 h adicionales y estimulados con LBK 1 μ M por 12 h.

4.9.2 Expresión de Profilagrina.

La estimulación de los queratinocitos con LDBK y BK1-5, 1 μ M provocó un aumento en la síntesis de profilagrina que fue mucho mayor que el inducido sobre la expresión de citoqueratina 10 (Fig. 12). También se puede decir que el pre-tratamiento de las células con IL-1 β no induce por si mismo un aumento en la producción de citoqueratina 10 o de profilagrina (Figs. 10, 11, 12 y 13). No obstante, el pre-tratamiento con IL-1 β y posterior estimulación con LDBK y/o BK1-5 parece inducir un aumento más acentuado en la producción de estas proteínas.

Las células estimuladas con LBK, 1 μ M presentaron un leve aumento en la síntesis de profilagrina con respecto a las células no estimuladas. Este aumento en profilagrina fue similar en las células pre-tratadas con IL-1 β y luego estimuladas con LBK (Fig. 13).

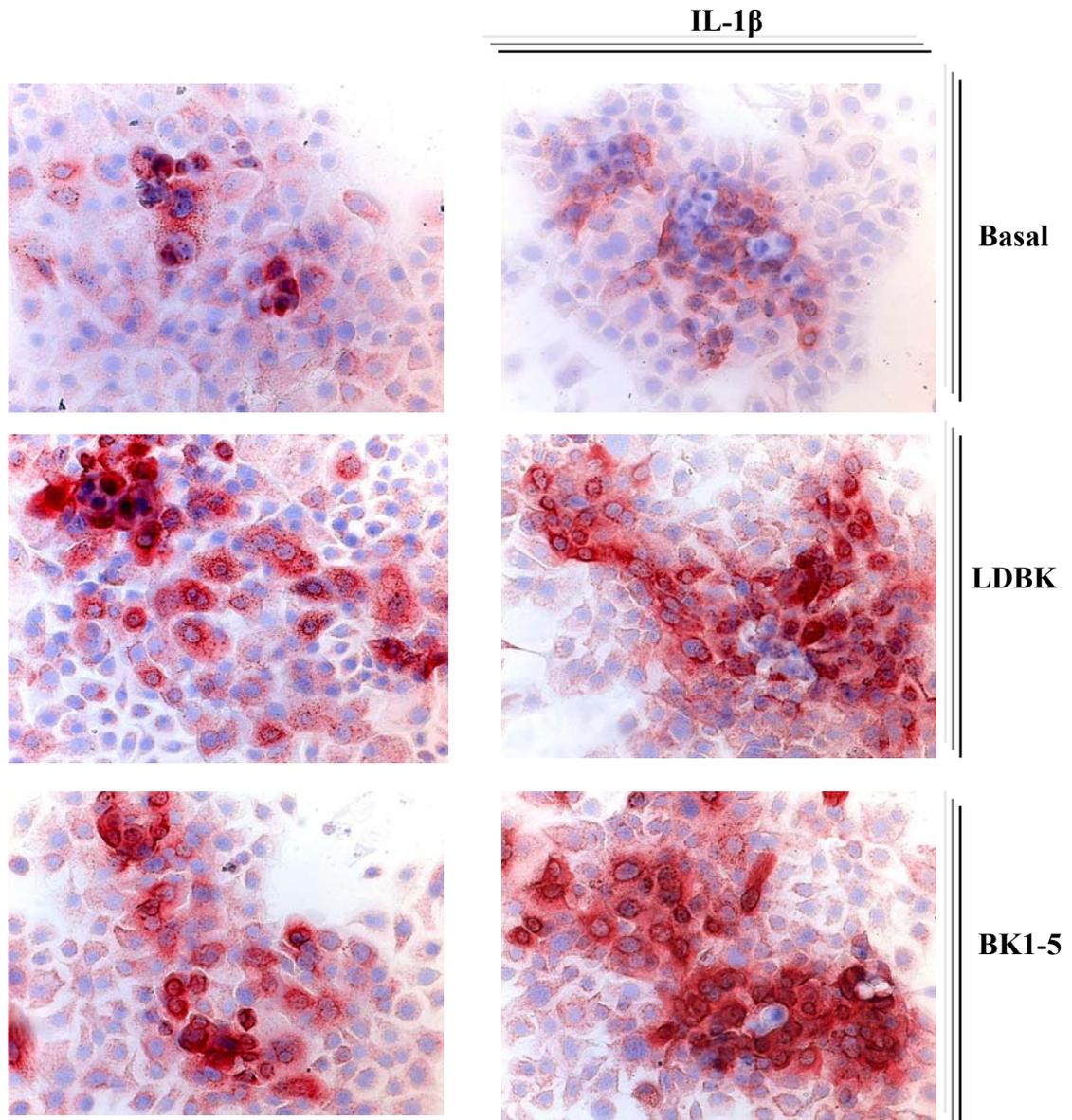
Profilagrina

Figura 12. Expresión de profilagrina en queratinocitos en cultivo pre-tratados con IL-1 β y estimulados con LDBK ó BK1-5 1 μ M. Los queratinocitos fueron mantenidos en medio basal por 48 h, tratados con IL-1 β por 12 h adicionales y estimulados con los agonistas por 12 h. Se detectó la profilagrina con un anticuerpo anti-profilagrina (1/500).

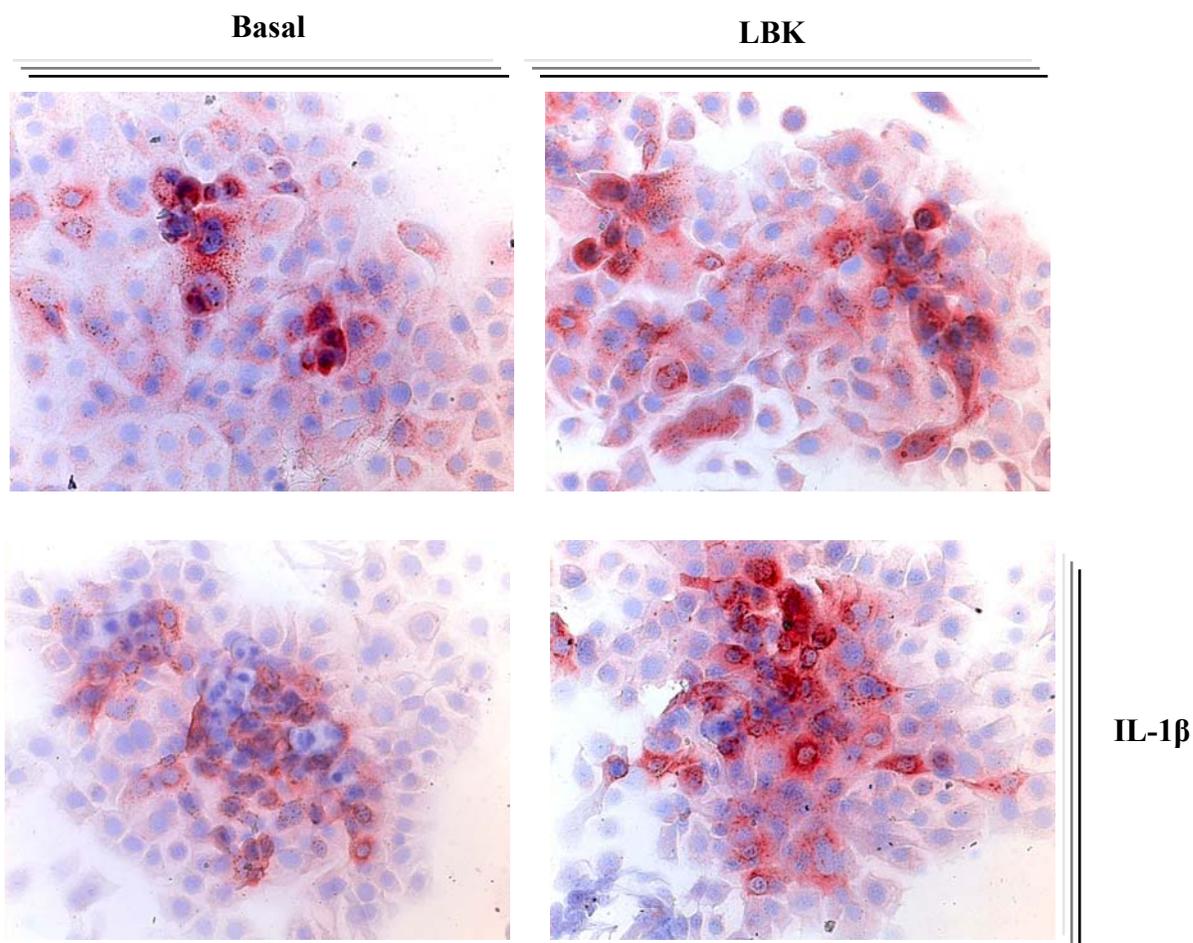
Profilagrina

Figura 13. Expresión de profilagrina en queratinocitos pre-tratados con IL-1 β y estimulados con LBK 1 μ M. Los queratinocitos fueron mantenidos en medio basal por 48 h, tratados con IL-1 β por 12 h adicionales y estimulados con LBK 1 μ M por 12 h.

5. DISCUSIÓN

La aplicación de técnicas inmunocitoquímicas y anticuerpos bien caracterizados permitieron corroborar la presencia de los receptores B1 y B2 de cininas en queratinocitos humanos en cultivo. Este resultado concuerda con ensayos autorradiográficos y ensayos de unión competitiva realizados previamente por otros autores para demostrar la presencia del receptor B2 de cininas en este tipo celular (Schremmer-Danninger y col, 1995). Los ensayos para determinar la expresión del RNA mensajero de estos receptores han revelado que ellos no sólo se expresan en cultivos primarios de células epidérmicas, sino también en la línea de queratinocitos humanos HaCaT y en muchos tipos celulares como fibroblastos embrionarios humanos (HEL299) y en la línea de células prostáticas insensibles a andrógenos (PC3), entre otros. En general, todos los tipos celulares expresan el receptor B1 en cantidades muy bajas (Phagoo y col, 1999; Barki-Harrington 2003, Hadad y col, 2000) donde la relación entre receptores B1 y B2 es de 1/85 en condiciones basales, pero disminuye 1/14 cuando el medio de cultivo contiene 10% de suero bovino fetal o se realiza en presencia de factores de crecimiento. Por otro lado, la relación se invierte cuando las células se pre-tratan con citoquinas como IL-1 β y TNF α o lipopolisacáridos bacterianos (Phagoo, 1999).

En el presente trabajo de tesis se pudo comprobar, por inmunocitoquímica, que el pre-tratamiento con IL-1 β fue suficiente para sobre-expresar el receptor B1. Ensayos semejantes se habían realizado en células musculares vasculares de conejo (Galizzi y col, 1994; Levesque y col, 1995a; Schneck y col, 1994), y en células IMR-90 (fibroblastos pulmonares fetales humanos). En este último modelo se determinó que IL-1 β inducía una expresión del receptor de 4 a 6 veces sobre el basal (Phagoo y col, 1999). El uso de inhibidores de síntesis proteica suprime este efecto,

indicando que IL-1 β induce la producción *de novo* del receptor. Esta citoquina es sintetizada por prácticamente todas las células, incluyendo los queratinocitos humanos. La síntesis de IL-1 β por los queratinocitos implicaría una estimulación autocrina constante para que estas células expresen receptores B1 bajo condiciones basales de cultivo (Dinarello, 1994). Si bien aún no se ha determinado el mecanismo por el cual IL-1 β estimula la expresión del receptor B1, una de las hipótesis que explican este proceso es que la regulación del gen del receptor B1, es controlado a nivel transcripcional por la activación del factor de transcripción NF- κ B que se uniría a regiones promotoras del gen del receptor B1, activando así su transcripción (Ni y col, 1998; Schanstra y col, 1998; Zhou y col, 1998). En el caso del receptor B2, la evidencia bibliográfica previa indica que IL-1 β no induce sobre-expresión de este receptor (Phagoo, 1999) lo que fue confirmado por los resultados aquí obtenidos donde la misma concentración suficiente para sobre-expresar el receptor B1 no tuvo un efecto aparente en la expresión de los receptores B2.

En todos los tipos celulares analizados hasta ahora, se ha visto que los receptores de cininas, están unidos a proteína G. La activación de estos receptores por sus agonistas específicos, conlleva a la activación de fosfolipasa C- β (PLC- β), con la consecuente generación de segundos mensajeros tales como, IP3 (inositol trifosfato), DAG (diacilglicerol) y calcio. Estos dos últimos activan varias isoformas de PKC, la que participa en variadas vías de señalización celular, entre ellas, la vía de las MAPK (Nishizuka, 1992). En la vía de las MAPK, PKC actúa estimulando ras, que es una proteína G pequeña, ésta a su vez estimula raf-1, y ésta a MEK la que finalmente fosforila MAPK (Davis, 1993; Tomic-Canic, 1998). Luego de fosforiladas, las MAPK translocan al núcleo para activar factores de transcripción implicados en la síntesis de DNA, división celular y diferenciación.

5.1 LOS RECEPTORES DE CININAS Y LA PROLIFERACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS

Existe vasta evidencia de la participación de los receptores de cininas en proliferación celular, en variados tipos celulares como fibroblastos humanos, donde la activación de receptores del tipo B2 de cininas por LBK, uno de sus agonistas específicos, induce la síntesis de DNA (Owen, Villereal, 1983). Un efecto mitogénico similar se presenta en células germinales de rata, donde la activación del receptor B2 por BK también estimula la síntesis de DNA; por el contrario, en este mismo tipo celular, la activación de los receptores B1 no tiene efecto mitogénico (Atanassova, 2003). No obstante, no existe un patrón único de acción de estos receptores y el proceso que se desencadena, luego de su estimulación, depende en parte del tipo celular activado.

En el proceso de proliferación y diferenciación celular, la vía de las MAPK tiene un rol preponderante. Estudios previos indican que la activación del receptor B1 por sus agonistas específicos LDBK y BK1-5, en queratinocitos humanos, desencadena una fosforilación transitoria de MAPK y su translocación al núcleo. El patrón transitorio de fosforilación se ha asociado, en el caso de otros receptores de 7 dominios transmembrana, con proliferación celular. Por el contrario, la fosforilación de MAPK inducida por el agonista del receptor B2, LBK produce un patrón sostenido en el tiempo, lo que se ha asociado con procesos de diferenciación celular (Matus 2003). En este respecto, la estimulación de los receptores B2 por LBK no provocó aumento de la incorporación de BrdU, resultado que concuerda con otros previos existentes en la bibliografía y que indican que BK no induce la proliferación del queratinocito. Sin embargo, los experimentos realizados en la presente tesis con los agonistas B1, LDBK y BK1-5 no apoyan esta propuesta, ya que la estimulación de los queratinocitos con distintas concentraciones de estos

péptidos no resultó en proliferación celular. Más aún, el pre-tratamiento de los cultivos con IL-1 β , para descartar que la falta de proliferación se debía a que los queratinocitos expresaban un bajo número de receptores B1, tampoco aumentó la incorporación de BrdU. Como era si de esperar, esta citoquina no modificó la respuesta de las células a la estimulación con el agonista B2, LBK.

Las prostaglandinas están implicadas en procesos celulares normales, así como también en procesos fisiopatológicos. Uno de los efectos que tiene la PGE₂, es la inhibición de la síntesis de DNA, fenómeno que ha sido observado en varios tipos celulares. (Kohyama y col, 2001; Pan y col, 2001). La síntesis de prostaglandinas requiere de la conversión de ácido araquidónico en PGH₂, ya sea por la ciclo-oxigenasa constitutiva, COX-1, o por COX-2, siendo esta última inducida por estímulos inflamatorios y mitogénicos. Subsecuentemente dos prostaglandina E sintetasas convierten PGH₂ en PGE₂ (Catley y col, 2003) Otro de los efectos de IL-1 β , es la capacidad de estimular, en células pulmonares (A549), la transcripción de COX-2 con la consecuente elevación de prostaglandinas y por tanto de PGE₂ que a su vez inhibiría la síntesis de DNA. Por esta razón y queriendo descartar esta consecuencia de IL-1 β , se utilizó diclofenaco sódico, un inhibidor de ambas ciclo-oxigenasas. Los resultados obtenidos demostraron que tras la estimulación con IL-1 β , el uso de diclofenaco sódico aumenta en un 39% la síntesis de DNA con respecto a las células tratadas solamente con IL-1 β , pero cuando los queratinocitos fueron subsecuentemente estimulados con LDBK o BK1-5, no se observó un aumento significativo en la incorporación de BrdU. Por lo tanto, se puede concluir que si bien IL-1 β sobre-expresa los receptores B1, la activación de estos receptores por sus agonistas LDBK y BK1-5 no induce un aumento considerable en la síntesis de DNA, sugiriendo que la activación de ambos receptores de cininas probablemente estimule otros procesos, tales como el de diferenciación celular.

La carencia de la acción mitogénica de las cininas está avalada por el uso de EGF como control positivo de la proliferación. Este ligando indujo un pico de síntesis de DNA que fue 1,5 a 2 veces el valor del basal cuando su concentración fue de 10 nM. Cuando se investigó el efecto que podrían tener los diferentes agonistas B1 y B2 sobre la proliferación inducida por EGF 10 nM se pudo constatar que LDBK en una concentración de 100 y 1000 nM aumentaba en un 50% la respuesta proliferativa inducida por EGF. En contraste, tanto LBK como BK1-5 a las mismas concentraciones no incrementaron el efecto mitogénico de EGF.

La transactivación del receptor de EGF (EGFR) mediada por estimulación de receptores acoplados a proteína G ocurre en diversos tipos celulares. En nuestro laboratorio se investigó si la estimulación del receptor B2 de cininas provocaba la transactivación de este receptor, llegándose a la conclusión que el EGFR es sólo parcialmente activado por LBK (Vidal y col, 2004). Lamentablemente existe escasa evidencia acerca de este mismo tipo de interacciones entre el EGFR y el receptor B1 de cininas. Existe evidencia que los EGFR aumentan en número luego de la estimulación por EGF, los cuales luego de llegar a un pico de expresión, se inhiben a través de un sistema de retroalimentación negativo. También se ha observado que bradicinina mantendría constante el número de EGFR, ejerciendo un efecto negativo de su sobre-expresión manteniéndose así un número constante de EGFR que escaparía al retroalimentación negativo y por consiguiente sería capaz de incrementar la proliferación en respuesta a EGF. Aunque esta evidencia estaría apoyando los resultados obtenidos en esta tesis, faltarían aún experimentos que avalen esta idea, pues en este caso, el péptido con el cual se vió un aumento en la síntesis de DNA, fue LDBK, y no BK (Van Zoelen y col, 1994). Si bien esta es una hipótesis que explica

este fenómeno, no se puede descartar que las vías de señalización de estos receptores se estén superponiendo y que en presencia de EGF, LDBK tenga un efecto mitogénico por si mismo.

5.2 LOS RECEPTORES DE CININAS Y LA DIFERENCIACIÓN DE QUERATINOCITOS HUMANOS

Tras determinar que tanto los agonistas B1 como B2 no desencadenaban proliferación celular, se exploró si la activación de estos receptores promovía la diferenciación celular. Para esto, se determinó la expresión de dos proteínas asociadas a la diferenciación del queratinocito: una utilizada como marcador de diferenciación temprana (citoqueratina 10) y otra de diferenciación tardía (profilagrina).

Las queratinas son una gran familia de proteínas, que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto de células epiteliales. Estas se organizan en paquetes que se extienden a través del citoplasma y se dividen en dos familias: tipo I o ácidas (citoqueratinas 10 a la 20) y las tipo II o básicas-neutras (citoqueratinas 1 a la 9) (Paramio y col, 1999). Citoqueratina 10 es una proteína específicamente sintetizada por queratinocitos que están sufriendo una diferenciación temprana, vale decir células en transito desde el estrato basal al espinoso, aunque se sigue sintetizando en el estrato granular. Por su parte profilagrina es sintetizada por células del estrato granular.

Utilizando estos marcadores se determinó que la estimulación de receptores B2 por LBK produce una diferenciación moderada de las células epidérmicas en cultivo. Cabe recordar que bajo las condiciones de cultivo utilizadas (medio bajo en calcio), prácticamente la totalidad de las células mantenidas en cultivo corresponden a células de tipo basal que expresan poco o nada de

citoqueratina 10 y profilagrina respectivamente. Los mismos marcadores de diferenciación permitieron comprobar que LDBK y BK1-5 inducían una fuerte síntesis de citoqueratina 10 y profilagrina, mucho mayor que la inducida por LBK. Aunque las queratinas han sido siempre consideradas como proteínas estructurales, estudios recientes indican que citoqueratina 10 contribuye a la inhibición de la proliferación celular, afectando el paso de G₁ a S, y modulan la actividad de pRb (Paramio y col, 1999). Por otra parte, el pretratamiento de las células con IL-1 β antes de la estimulación con LDBK y BK1-5 indujo un aumento en la síntesis de ambos marcadores de diferenciación.

Trabajos previos indican que en respuesta a la estimulación del receptor B2 se produce, en el queratinocito, la translocación nuclear de NF- κ B, una rápida expresión de c-fos, factores de transcripción que han sido implicados en la regulación del programa de diferenciación del queratinocito humano (Vidal y col, 2004). Sin embargo, no existen evidencias similares que expliquen el efecto diferenciador inducido por los agonistas del receptor B1.

AP-1 es un complejo de transcripción nuclear, compuesto de homo y hetero-dímeros de la familia de proto-oncogenes fos y jun. Este complejo en el queratinocito está ligado al crecimiento y la diferenciación celular (Angel y col, 2001; Tomic Canic y col, 1998). La expresión de c-fos en los estratos espinosos y granular de la piel humana sugiere que esta molécula estaría implicada en su proceso de diferenciación (Angel y col, 2001). La función de AP-1 en el queratinocito en diferenciación sería llevada a cabo por su unión a regiones promotoras de los genes de citoqueratinas, activando su transcripción (Pankov y col, 1994; Oshima y col, 1990). Paralelamente una alta expresión del gen de profilagrina en queratinocitos humanos depende de la formación de heterodímeros c-jun/c-fos (Jang y col, 1996).

En conclusión los experimentos realizados en esta tesis sugieren fuertemente que los agonistas de tipo B1 provocan una estimulación de la diferenciación del queratinocito humano en cultivo, la cual puede ser sobreestimulada al pre-tratar las células con IL-1 β .

Todas estas interrelaciones entre receptores B1, B2, EGF, IL-1 β , así como las vías activadas, y los factores de transcripción involucrados, se encuentran esquematizados en la figura 14.

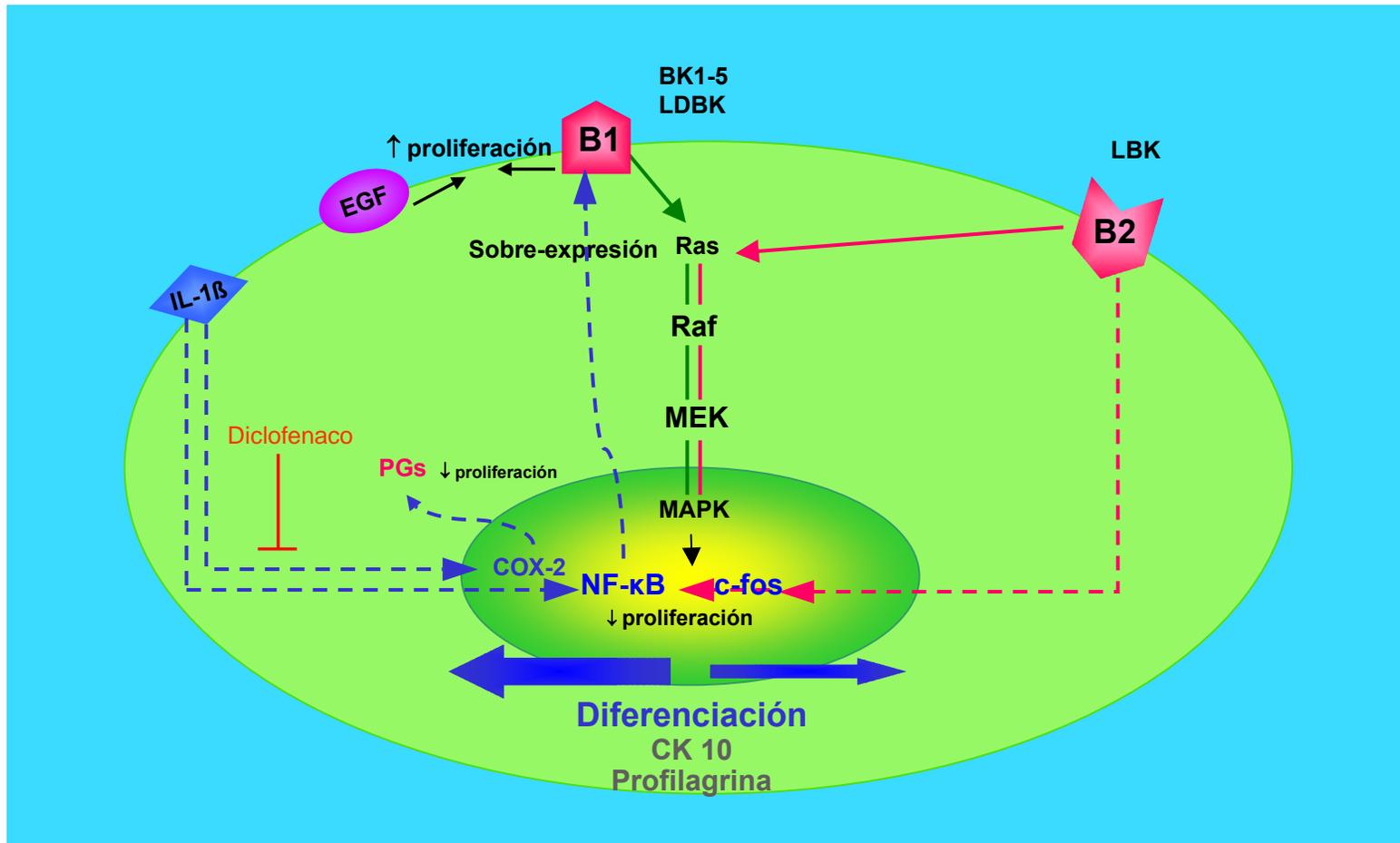


Figura 14. Representación esquemática de los eventos activados por los receptores B1 y B2 de cininas así como de los factores que influyen su expresión

6. BIBLIOGRAFÍA

Angel, P., Szabowski, A., Schorpp-Kistner, M. (2001) Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene.*, 20, 2413-2423.

Atanassova, N. N., (2003) B₂ bradykinin receptor mediates the stimulatory effect of bradykinin on rat germ cell proliferation *in vitro*. *Andrologia.*, 35, 13-16.

Barki-Harrington, L., Bookout, A., Wang, G., Lamb, M., Leeb-Lundberg, F., Daaka, Y. (2003) Requirement for direct cross-talk between B1 and B2 kinin receptors for the proliferation of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells. *Biochem J.*, 371,581-587.

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

Blaukat, A. (2003) Structure and signaling pathways of kinin receptors. *Andrologia.*, 35, 17-23.

Blumenberg, M. (1994) Keratinocytes: Biology and Differentiation. *Cutaneous Medicine and Surgery*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders., 1,58-74.

Catley, M. C., Chivers, J. E., Cambridge, L. M., Holden, N., Slater, D. M., Staples, K. J., Bergmann, M. W., Loser, P., Barnes, P. J., Newton, R. (2003) IL-1L-dependent activation of NF- κ B mediates PGE₂ release via the expression Of Cyclooxygenase-2 And Microsomal Prostaglandin E Synthase. *FEBS Letters.*, 547, 75-79.

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

Dengler, R., Faussner, A., Muller-Esterl, W., Roscher, A. A., (1990) [Hyp3]-bradykinin and [Hyp3]-Lys-bradykinin interact with B₂ bradykinin receptor and stimulate inositol phosphate production in cultured human fibroblasts. *FEBS Lett.*, 262, 111-114.

Dinarello, C. A. (1994) The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokin Network.*, 5, 517-531.

Duncan, A. M., Kladis, A., Jennings, G. L., Dart, A. M., Esler, M., Campbell, D. J. (2000) Kinins in humans *Am J Physiol.*, 278, R897-R904.

Eckert, R. L. (1989) Structure, Function, and differentiation of the keratinocyte (Review). *Physiol Rev.*, 69, 1316-46.

Fairley, J. A., Zivony, D., (2001) Epidermal kinetics and regulation of cell proliferation. En: The biology of the skin. Freinkel, R. K., Woodley, D. T., The Parthenon Publishing Group. New York 201-231.

Fathy, D. B., Kyle, D. J., Leeb-Lundberg, L. M. (2000) High-Affinity binding of peptide agonists to the human B1 bradykinin receptor depends on interaction between the peptide N-terminal L-lysine and the fourth extracellular domain of the receptor. *Mol Pharmacol.*, 57, 171-179.

Figuroa, C. D., Gonzalez, C. B., Grigoriev, S., Abd Alla, S. A., Haasemann, M., Jarnagin, K., Muller-Esterl, W. (1995) Probing for the bradykinin B2 receptor in rat kidney by anti-peptide and anti-ligand antibodies. *J Histochem Cytochem.*, 43, 137-148.

Figuroa, C. D., Muller-Esterl, W. (1998) Autorradiographic and immunological techniques to analyse kinin receptor distribution in rat and human tissues. *Biol Res.*, 31, 175-187.

Fuchs, E. (1990) Epidermal differentiation: The bare essentials. *J Cell Biol.*, 111, 2807-14.

Fuchs, E., Green, H. (1980) Changes in keratin expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell.*, 19, 1033-1042.

Galizzi, J. P., Bodinier, M. C., Chapelain, B., Ly, S. M., Coussy, L., Gireaud, S., Neliat, S. & Jean, T. (1994). Up-regulation of [³H]-des-Arg¹⁰-Kallidin binding to the bradykinin B1 receptor

by interleukin-1 β in isolated smooth muscle cells: correlation with B1 agonist-induced PGI₂ production. *Br J Pharmacol.*, 113, 389-394.

Gobeil, F., Neugebauer, W., Nguyen-Le, X.K., Nea Allogho, S., Pheng, L.H., Blouin, D., Whalley, E.T., Regoli, D. (1997) Pharmacological profiles of the human and rabbit B1 receptors *Can J Physiol Pharmacol.*, 75, 591-5.

Haddad, E., Fox, A., Rousell, J., Burgess, G., Mcintyre, P., Barnes, P. J., Fanf Chun, K. (2000) Post.Transcripcional regulation of bradykinin B1 and B2 receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor- α : modulation by dexamethasone. *Mol Pharmacol.*, 57, 1123-1131.

Hasan. A. A., Rebello. S. S., Smith. E., Srikanth. S., Werns. S., Driscoll. E., Faul. J., Brenner. D., Normolle. D., Lucchesi. B. R., Schmaier. A. H. (1999) Thrombostatin inhibits induced canine coronary thrombosis. *Thromb Haemost.*, 82, 1182-1187.

Hess. J. F., Derrick, A. W., Macneil, T., Borkowski, J. A. (1996) The agonist selectivity of a mouse B1 bradykinin receptor differs from human and rabbit B1 receptors. *Immunopharmacol.* 33:1-8.

Howl, J., Payne, S. J. (2003) Bradykinin receptors as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.*,7, 277-285.

Jang, S. I., Steinert, P. M., Markova, N. G. (1996) Activator Protein 1 Activity Is Involved in the Regulation of the Cell Type-specific Expression from the Proximal Promoter of the Human Profilaggrin Gene. *J Biol Chem.*, 271, 24105-24114.

Jost, M., Kari, C., Rodeck, U., (2000) The EGF receptor- an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol.*, 10, 505-510.

Kohyama, T., Ertl, R. F., Valenti, V., Spurzem, J., Kawamoto, M., Nakamura, Y., Veys, T., Allegra, L., Romberger, D., Rennard, S.I., (2001) Prostaglandin E2 inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281, L1257–L1263.

Kozic, A., Moore, R. B., Potempa, J., Imamura, T., Rapala-Kozic, M., Travis, J. (1998) A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. *J Biol Chem.*, 273, 33224-33299.

Levesque, L., Larrivée, J. F., Bachvarov, D., Rioux, F., Drapeau, G., Marceau, F. (1995) Regulation of kinin-induced contraction and DNA synthesis by inflammatory cytokines in smooth muscle of the rabbit aorta. *Brit jour of Pharmacol.*, 116, 1673-1679.

Majima, M., Nishiyama, K., Iguchi, Y., Yao, K., Ogino, M., Ohno, T., Sunahara, N., Katoh, K., Tatemichi, N., Takei, Y., Katori, M. (1996) Determination of bradykinin-(1-5) in inflammatory exudate by a new ELISA as a reliable indicator of bradykinin generation. *Inflamm Res.*, 45, 416-423.

Marceau, F., Hess, J. F., Bachvarov, D. R. (1998) The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev.*, 50, 357-386.

Matus, C. E. (2003) Bradicinina 1-5 activa el receptor B1 de cininas e induce la fosforilación de MAPK en células epidérmicas humanas en cultivo. Tesis Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 52 pp.

Menke, J. G., Borkowski, J. A., Bierilo, K. K., MacNeil, T., Derrick, A. W., Schneck, K. A., Ransom, R. W., Strader, C. D., Linemeyer, D. L., Hess, J. F. (1994) Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem.*, 269, 21583-21586.

Muller-Esterl, W. (1989) Kininogens, kinins and kinships. *Thromb Haemost.* 28, 61(1):2-6.

Murphey, L., Hachey, D., Oates, J., Morrow, J., Brown, N. (2000) Metabolism of Bradykinin In Vivo in humans: Identification of BK1-5 as a stable plasma peptide metabolite. *Am Soc for Pharmacol and Exp Therapeut.*, 294, 263-269.

Ni, A., Chai, K. X., Chao, L., Chao, J. (1998) Molecular cloning of the rat bradykinin B1 receptor. *Biochim Biophys Acta.*, 1442, 177-185.

Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.*, 258, 607-614.

Oshima, R. G., Abrams, L. (1990) Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev.*, 4, 835-48.

Owen, N. E., Villereal, M. L. (1983) Lys-bradykinin stimulates Na⁺ influx and DNA synthesis in cultured human fibroblasts. *Cell.*, 32(3), 979-85.

Pan, T., Mason, R. J., Westcott, J. Y., Shannon, J.M.(2001) Rat alveolar type II cells Inhibit lung fibroblast proliferation *In Vitro*. *Am J Of Resp Cell and Mol. Biol.*, 25, 353-361.

Pankov, R., Neznanov, N., (1994) AP-1, ETS, and transcriptional silencers regulate retinoic acid-dependent induction of keratin 18 in embryonic cells. *Mol Cell Biol.*, 14, 7744-57.

Paramio, J. M., Casanova, LL. M., Segrelles, C., Mittnacht, S., Lane, B. E., Jorcano, J. L. (1999) Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cel Biol.*, 19 (4), 3086-3094.

Phagoo, S., Poole, S., Leeb-Lundberg, F.(1999). Autoregulation of Bradykinin receptors: Agonists in the presence of interleukin-1 β in human lung fibroblasts. *Am Soc Pharmacol Exp. Therapeut.*, 56, 325-333.

Potten, C. S. (1974) The epidermal proliferative unit: the possible role of central basal cell. *Cell Tissue Kinet.*, 7, 77-88.

Regoli, D., Barabé, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.*, 32, 1-46.

Roop, D. R., Krieg, T. M. (1988) Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.*, 48, 3245-52.

Schanstra, J. P., Bataille, E., Marin Castano, M. E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J. B., Pecher, C., Gauthier, F., Girolami, J. P., Bascands, J. L. (1998) The B1-agonist [des-Arg¹⁰]-Kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest.*, 101, 2080-2091.

Schneck, K. A., Hess, J. F., Stonesifer, G. Y. & Ransom, R. W. (1994). Bradykinin B1 receptors in rabbit aorta smooth muscle cells in culture. *Eur J Pharmacol.*, 266, 277-282.

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

Schremmer-Danninger, E., Hermann, A., Fink, E., Fritz, H., Roscher, A. A. (1999) Identification and occurrence of mRNAs for components of the Kallikrein-kinin system in human skin and skin diseases. *Inmunopharmacol.*, 43, 287-291.

Sethi, T., Rozengurt, E. (1991). Multiple neuropeptides stimulate clonal growth of small cell lung cancer: effects of Bradykinin, Vasopressin, Cholecystokinin, Galanin, and Neurotensin. *Cancer Res.*, 51, 3621-3623.

Sheikh, I. A., Kaplan, A. P. (1986b) Studies of the digestion of bradykinin, lysyl bradykinin, and kinin-degradation products by carboxipeptidases A, B, and N. *Biochem Pharmacol.*, 35, 1957-1963.

Shima, C., Majima, M., Katori, M. (1992) A stable metabolite, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, of bradykinin in the degradation pathway in human plasma. *Japan J Pharmacol.*, 60, 111-119.

Simon, M., Green, H. (1984) Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte. *Cell.*, 36, 827-34.

Tomic-Canic, M., Komine, M., Freedberg, I. M., Blumenberg, M. (1998) Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J Dermatol Sci.*, 17, 167-181.

Van Zoelen, E. J. J., Peters, P. H. J., Afink, G. B., Van Genesen, S., De Roos, A. D. G., Van Róterdam, W., Theuvenet, P. R., (1994) Bradykinin-induced growth inhibition of normal rat kidney (NRK) cells is paralleled by decrease in epidermal-growth-factor receptor expression. *Biochem. J.*, 298, 335-340.

Vidal, M. A., Astroza A., Matus, C., Ehrenfeld, P., Pavicic, F., Sánchez, T., Salem, C., Figueroa, J., Concha, M, Gonzalez, C. B., Figueroa, C. D (2004) Kinin B2 receptor coupled signal transduction in human cultured keratinocytes. *J Invest In dermatol.* (en prensa)

Ward, P. E., (1991) Metabolism of bradykinin and bradykinin analogs, in *Bradykinin Antagonists* (Burch RM ed) pp 147-170, Marcel Dekker, New York).

Weinstein, G. D., McCullough, J. L., Ross, P. A. (1985) Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol.*, 85, 579-83.

Zhou, X., Polgar, P., Taylor, L. (1998) Roles for interleukin-1 β , phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B1 receptor gene expression. *Biochem. J.*, 330, 361-366.