



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor patrocinante

Dr. Miguel Concha M.

Instituto de Histología y Patología

Facultad de Medicina

Profesor Co-patrocinante

Dr. Ignacio Moreno V.

Instituto de Química

Facultad de Ciencias

**EMPLEO DE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE PIEL
PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES
QUE REGULAN EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN
DE LA EPIDERMIS HUMANA**

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

MARIA ELENA ARIAS CEA

VALDIVIA-CHILE

2005

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la finalización de esta etapa de mi vida académica, en especial a mis padres Ricardo y Elena, por su apoyo incondicional, fortaleza y cariño.

A mi profesor patrocinante, el Dr. Miguel Concha por permitirme realizar mi trabajo de Tesis en su laboratorio, en un ambiente grato en el cual encontré su apoyo y disposición lo cual contribuyó para el mejoramiento de mi trabajo. Además quiero expresarle mi cariño, respeto y gratitud por entregarme las herramientas necesarias para concluir esta nueva etapa.

También quiero agradecer a la Dra. Alejandra Vidal y el Dr. Carlos Figueroa por sus consejos y buena disposición. Agradezco también a mis compañeros Carola, Pamela, Francisca y Angel, quienes siempre con su buen humor y disponibilidad hicieron que la labor de algunos días fuera menos pesada.

Finalmente y de forma especial quiero dar las gracias a Rodrigo por su amor y comprensión en cada momento.

Esta Tesis fue financiada por los Proyectos DID-UACH S200333 (Dra. Alejandra Vidal) y S200411 (Dr. Miguel Concha).

ÍNDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN	10
1.1 SUMMARY	11
2. INTRODUCCIÓN	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Aislamiento de queratinocitos humanos	17
3.2 Aislamiento de fibroblastos dérmicos humanos	18
3.3 Cultivos organotípicos de piel	18
3.4 Histología e Inmunocitoquímica	20
3.5 Microscopía electrónica de transmisión	21
3.6 Estadística	21
4. RESULTADOS	23
4.1 Los fibroblastos regulan la formación de la epidermis en cocultivos organotípicos de piel.	23
4.2 Normalización de la expresión de los marcadores de proliferación y diferenciación epidérmica en cultivos organotípicos.	26
4.3 Influencia del número de fibroblastos en el desarrollo de la membrana basal epidérmica.	26
4.4 Los fibroblastos inducen la expresión de los factores de transcripción	29

nuclear epidérmicos AP-1/c-Jun, NFκB/p-50 y Egr-1 en cocultivos organo-
típicos de piel. Posible influencia de factores solubles.

5. DISCUSIÓN 39

6. LITERATURA CITADA 50

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Fig. 1 Cultivo tridimensional de células HaCaT sobre matrices de colágeno pobladas con fibroblastos dérmicos.	24
Fig. 2 Efecto del número de fibroblastos sobre el crecimiento y maduración de la epidermis.	25
Fig. 3 Normalización progresiva de la expresión de marcadores de la proliferación y diferenciación celular en cultivos organotípicos de piel.	27
Fig. 4 Efecto del número de fibroblastos sobre el desarrollo de la membrana basal en cultivos organotípicos de piel.	28
Fig. 5 Ultraestructura de cultivos organotípicos de piel	30
Fig. 6 Expresión de AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 durante el desarrollo de la epidermis en cultivos organotípicos de piel.	32

- Fig. 7** Demostración de la localización nuclear de la inmunorreactividad para los factores de transcripción AP-1/c-Jun y NFκB/p50 en cultivos organotípicos de células HaCaT. 33
- Fig. 8** Efecto del número de fibroblastos sobre la expresión temprana de AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 en cultivos organotípicos de piel. 36
- Fig. 9** Inmunorreactividad nuclear temprana a los factores de transcripción AP-1/c-Jun y NFκB/p50. 37
- Fig. 10** Importancia de los factores de transcripción AP-1/c-Jun, NFκB/p50y Egr-1 en el crecimiento y maduración epidérmica dependiente de la interacción fibroblasto-queratinocito. 47

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINAS
Tabla I Anticuerpos monoclonales y policlonales utilizados en este estudio	22
Tabla II Genes epidérmicos que presentan sitios de unión en su promotor para los factores de transcripción nuclear AP-1 y NFκB	44

ABREVIATURAS

AP-1: Proteína de activación 1

BrdU: Bromodeoxiuridina

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil Sulfoxido

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

Egr-1: Respuesta al crecimiento temprano 1

ERK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

GM-CSF: Factor formador de colonias de granulocitos y monocitos

ICAM: Moléculas de adhesión celular

I κ B: Inhibidor de κ B

IL-1: Interleuquina 1

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos

NF- κ B: Factor nuclear - κ B

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaqueta

SFB: Suero fetal de bovino

TNF: Factor de necrosis tumoral

TGF- α : Factor transformador del crecimiento α

1. RESUMEN

Diversas evidencias indican que los fibroblastos participan en la inducción de la diferenciación epidérmica mediante un mecanismo secretorio paracrino doble dependiente de la interacción funcional entre queratinocitos y fibroblastos. Por otra parte, se ha observado que los factores de transcripción nuclear AP-1 y NFκB participan en la inducción de la diferenciación de los queratinocitos humanos. En esta Tesis se investigó si la activación de AP-1/c-Jun y NFκB/p50 y Egr-1 durante la diferenciación epidérmica depende o no de los fibroblastos. Con este objetivo se prepararon cultivos organotípicos de piel con matrices de colágeno tipo I, pobladas o no con fibroblastos dérmicos y cubiertas con células HaCaT o queratinocitos humanos normales. La morfogénesis del tejido obtenido fue estudiada a diferentes lapsos de tiempo con técnicas histológicas convencionales la expresión de diversos marcadores de la proliferación y diferenciación celular se analizó con inmunohistoquímica y la formación de la membrana basal con histoquímica, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión. La expresión de los factores de transcripción nuclear AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 se estudió con inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos revelaron que la morfogénesis epidérmica es el resultado de la combinación crítica de matriz extracelular colonizada por fibroblastos, y de queratinocitos en proliferación en su superficie. Más importante aún, nuestros resultados sugieren por primera vez que los fibroblastos participan en la diferenciación del queratinocito induciendo en estos la expresión y translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1/c-Jun NFκB/p50 y Egr-1 y, simultáneamente, la estratificación epidérmica. Es muy probable que este efecto dependa de productos secretorios producidos por los fibroblastos.

1.1 SUMMARY

Recent studies demonstrate that fibroblasts actively control epidermal differentiation by means of a double paracrine mechanism dependent of keratinocyte and fibroblast crosstalking. In addition, it has been observed that both transcription factors AP-1 and NFkB play a role in the induction of human keratinocyte differentiation. In this Thesis we investigate if AP-1/c-Jun, NFkB/p50 and Egr-1 activation induced during the epidermal differentiation depends or not on fibroblasts. With this aim, organotypic cultures of skin were produced using matrices of collagen type I, settled or not with dermal isolated fibroblasts and covered with HaCaT cells or normal human keratinocytes. Morphogenesis of the neoepidermis was analysed at different time intervals with conventional histological techniques; cellular proliferation and differentiation markers by immunohistochemistry; and basal membrane formation by means of histochemistry, immunohistochemistry and transmission electronic microscopy. Expression of transcription factors AP-1/c-Jun, NFkB/p50 and Egr-1 was analysed using immunohistochemistry. The results obtained confirmed that epidermal morphogenesis is the product of the critical combination of extracellular matrix colonized by fibroblasts, and keratinocytes proliferating on its surface. More important, our results suggest for the first time that fibroblasts regulate keratinocyte differentiation inducing the expression and nuclear translocation of transcription factors AP-1/c-Jun, NFkB/p50 and Egr-1, and simultaneously epidermal stratification. This effect could be mediated by fibroblast secretory factors.

2. INTRODUCCIÓN

La regeneración y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos epiteliales depende de complejas interacciones entre las células epiteliales y las células del estroma adyacente. Esta idea ha sido bien apreciada en estudios de curación de heridas, trasplantes y cultivo celular realizados en piel que demuestran que estas interacciones dependen de una red de citoquinas y de factores de crecimiento. El resultado es la regulación del funcionamiento de los queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos (Maas-Szabowski y col, 2003).

In vivo estos procesos son difíciles de estudiar debido a las múltiples variables involucradas, los diferentes tipos celulares dérmicos así como la influencia dominante de los factores sistémicos transportados por la circulación sanguínea. Por esta razón, resulta más apropiado emplear modelos simplificados que reproducen *in vitro* las interacciones dermo-epidérmicas y su influencia sobre la proliferación y diferenciación de las células epidérmicas. Desde los trabajos pioneros de Rheinwald y Green (1975, 1977) se han desarrollado diferentes modelos de cultivos organotípicos de piel. En los más sencillos, los queratinocitos se cultivan sobre membranas porosas libres de células, membranas cubiertas con proteínas de la matriz extracelular y sobre fibroblastos (Rosdy y Clauss, 1990; Limat y col, 1996; Ponc y col 1997; Schoop y col, 1999). Una aproximación más directa a la situación *in vivo* es el cultivo de los queratinocitos en dermis desepidermizada y desvitalizada en condiciones tales que la membrana basal no es afectada (Regnier y Darmon 1991; Gibbs y col 1997; Andriani y col, 2003). Una alternativa especialmente interesante la representa el uso de geles de colágeno tipo I (el más abundante en la dermis) conocidos como *mallas de colágeno hidratado* (Elsdale y Bard, 1972). La colonización de

estos geles con fibroblastos proporciona un sustrato apropiado que induce el crecimiento polarizado de los queratinocitos basales y su consiguiente estratificación (Bell y col 1981; Asselineau y col, 1989). Las semejanzas con la epidermis nativa aumentan aún más si los nutrientes difunden desde la neo-dermis hacia la neo-epidermis, como ocurre *in vivo*, y si los cultivos se efectúan en una interfase aire-líquido en la cual el equivalente epidérmico queda expuesto al aire. En estas condiciones se desarrollan epitelios ortoqueratóticos que evolucionan y persisten hasta tres o cuatro semanas en cultivo (Stark y col, 1999). En estas condiciones la cinética de proliferación de los queratinocitos durante las dos primeras semanas es similar a la respuesta proliferativa observada en la regeneración cutánea (Breitkreutz y col, 1997; Stark y col, 1999); su declinación posterior a niveles basales y la restricción de las divisiones celulares al estrato proliferativo, sugiere la consolidación de la homeostasis de la neo-epidermis. El análisis de diferentes marcadores de la diferenciación celular confirma estos hallazgos histológicos. Por ejemplo, integrina- $\beta 1$, un indicador de la fase temprana de la diferenciación se localiza suprabasal; e-cadherina, marcador de estados intermedios de diferenciación, se localiza en las capas equivalentes al estrato espinoso; filagrina, transglutaminasa-1 y loricrina, tres indicadores de la diferenciación tardía, se expresan en el estrato granuloso-símil (Stark y col, 2001; Maas-Szabowski y col, 2002).

Los cultivos organotípicos han permitido demostrar que la proliferación de los queratinocitos depende de las células del mesénquima (Maas-Szabowski y col, 1999). En efecto, el co-cultivo con fibroblastos *letalmente irradiados* estimula la proliferación de los queratinocitos. Este no es el resultado de la utilización pasiva de factores solubles constitutivamente producidos por fibroblastos sino que es la respuesta a un mecanismo

paracrino doble dependiente de ambas células. Mediante la producción y liberación de interleuquina (IL)-1 α y β los queratinocitos activan la producción del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y del factor formador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (Maas-Szabowski y col, 1999). Como resultado, se produce la proliferación de los queratinocitos *in vitro* (Maas-Szabowski y col, 1999; Mann y col, 2001).

Recientemente se ha comunicado que los factores transcripcionales AP (Activating Protein)-1 y NF κ B (Nuclear Factor- κ B) participan en el control de la proliferación e inducción de la diferenciación de los queratinocitos. AP-1 corresponde a un sistema de proteínas homo o heterodiméricas, compuesto por los monómeros Jun, Fos y proteínas de la familia ATF, que participa en el control de la proliferación celular, de diferenciación, de apoptosis y de la transformación oncogénica (Angel y col, 1991; Jochum y col, 2001). En las células epidérmicas de ratón, c-Jun actúa regulando positivamente la proliferación celular y JunB frena la progresión en el ciclo celular favoreciendo la diferenciación (Angel y col, 2001). En piel humana la expresión de c-Jun y c-Fos esta restringida a las células del estrato granuloso, las cuales no proliferan y expresan bajas cantidades de JunB y JunD (Angel y col, 2001). Por otra parte, NF κ B corresponde a una familia de proteínas cuyos miembros son p50 (NF κ B1), p52 (NF κ B2), p65 (Rel A), Rel B y c-Rel. NF κ B se encuentra en el citoplasma unido a una subunidad inhibitoria, I κ B (Mercurio y Manning, 2000). La fosforilación de I κ B permite la disociación del complejo de proteínas NF κ B y su posterior translocación al núcleo donde activa genes involucrados en la respuesta inflamatoria, en la respuesta inmune y en la división celular (Takao y col, 2003). Identificado originalmente como un regulador de la expresión de los genes de la cadena liviana kappa en linfocitos B

murinos; hoy se conoce que NF κ B regula la expresión de citoquinas, proteínas quimiotácticas, moléculas de adhesión y proteínas de la matriz extracelular comprometidas en mecanismos inflamatorios, respuesta inmunológica, diferenciación celular, promueve la proliferación celular, inhibe la apoptosis y activa la respuesta al estrés celular (Baeuerle y Baltimore, 1996; Akira y col, 1997; Barnes y Karin, 1997). Los resultados obtenidos con animales transgénicos que expresan subunidades I κ B α , p50 y p65 mutantes han permitido a Seitz y col (1998) proponer que NF κ B promueve la diferenciación de las células epidérmicas.

No obstante estos resultados, no es conocido si la diferenciación de los queratinocitos inducida por fibroblastos depende o no de los factores de transcripción NF κ B y AP-1.

En esta Tesis se plantearon los siguientes objetivos. Primero, poner en marcha el cultivo organotípico de piel utilizando matrices de colágeno tipo I pobladas con fibroblastos dérmicos humanos y cubiertas con queratinocitos humanos normales o de la línea celular HaCaT. Segundo, evaluar la similitud del equivalente epidérmico producido, con la epidermis *in situ*. Con este objetivo, la morfogénesis se analizó con técnicas histológicas convencionales la expresión de marcadores de proliferación y diferenciación celular con inmunohistoquímica y la formación de la membrana basal con histoquímica, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión. Tercero, investigar la expresión de los factores de transcripción AP-1/c-Jun, NF κ B/p50 y Egr-1 en queratinocitos y células HaCaT y su relación funcional con los fibroblastos. Los resultados obtenidos revelan que la combinación de matriz extracelular colonizada por fibroblastos y de

queratinocitos humanos o de la línea HaCaT, en proliferación en su superficie, es crítica para la regulación de la homeostasis epidérmica. Más importante aún, nuestros resultados sugieren que los fibroblastos participan de manera sustancial en la diferenciación del queratinocito, induciendo en éstos la expresión y translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1/c-Jun, NFkB/p50 y Egr-1 y simultáneamente la estratificación epidérmica. Es muy probable que este efecto dependa de factores secretorios producidos por el fibroblasto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento de queratinocitos humanos

Los queratinocitos fueron aislados de biopsias de piel de individuos sometidos a cirugía abdominal reparadora de acuerdo a un método estándar (Concha y col, 2003). Con este objetivo se obtuvieron con querátomo, láminas dermo-epidérmicas que fueron tratadas con tripsina 0,05% en medio Hanks sin Ca^{2+} y Mg^{2+} por 60 min a 37°C. Este procedimiento permitió separar la epidermis de la dermis. A continuación, las epidermis fueron disgregadas mediante fraccionamiento con uso de tijera y repipeteo; los queratinocitos obtenidos se contaron y se determinó viabilidad celular mediante exclusión de azul Tripiano. Las células se cultivaron sobre fibroblastos NIH 3T3 previamente tratados con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mitomicina C (Sigma, Chemical Co., USA) durante 3 hrs y 30 min a 37°C (Matus, 2004). Los cultivos se efectuaron en mezcla de medio Dulbecco's Modified Eagle Medium 1,8 mM Ca^{2+} (DMEM, Gibco Invitrogen Corporation, USA) y Ham *F-12* (Gibco) en proporción de 3:1, suplementado con 10% suero fetal de bovino (SFB; Gibco), hidrocortisona 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma), toxina colérica 10^{-10} M (Sigma), insulina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ factor de crecimiento epidérmico (EGF; Sigma), 1% penicilina G-estreptomicina (Gibco) y Fungizona® 1% (Gibco). Luego de alcanzada la confluencia (14 días) las células fueron recuperadas con tripsina 0,25%-EDTA 1mM, resuspendidas en medio de congelación DMSO (Gibco) y conservadas en nitrógeno líquido hasta su utilización. Para los experimentos se utilizaron queratinocitos de dos o tres pasajes.

3.2 Aislamiento de fibroblastos dérmicos humanos

Los fibroblastos dérmicos fueron preparados a partir de dermis restantes del aislamiento de queratinocitos. Las dermis fueron lavadas en Hanks` Balanced Salt Solution-10% SFB (Gibco) y cortadas en trozos pequeños (8 mm x 3 mm). A continuación se extendieron “en seco” sobre placas Petri de poliestireno de 100 mm de diámetro (Nunc, USA) durante 2 hrs a 37°C. Agregándoseles 1 ml de medio DMEM-50% SFB (Gibco) que contenía penicilina-estreptomicina 2% (10000 UI/ml de penicilina G sódica y 10000 µg/ml de sulfato de estreptomicina; Gibco) y Fungizona® 2% (250 µg/ml de anfotericina B y 205 µg/ml de desoxicolato de sodio; Gibco). Después de 24 hrs se adicionó diariamente 1 ml de medio DMEM (Gibco) suplementado con 50% SFB (Gibco) y antibióticos hasta completar 5ml. Los trozos de dermis fueron eliminados con pinzas estériles una semana más tarde y las células en cultivo se mantuvieron hasta la subconfluencia. Los queratinocitos contaminantes se eliminaron desalojando las neoepidermis completas de las placas con pinzas estériles. Después de 1-2 pasajes, los fibroblastos obtenidos fueron tratados con tripsina-EDTA y criopreservados en nitrógeno líquido hasta su uso.

3.3 Cultivos organotípicos de piel

Para la producción de los cultivos organotípicos se aisló colágeno tipo I de tendones de cola de ratas Rockefeller de acuerdo al método de Shoop y col (1999). Las colas (dos) fueron cortadas sagitalmente, eliminándose la piel con la ayuda de pinzas quirúrgicas. A continuación, desde el extremo distal cada tendón fue separado en fibras colágenas (“hilos color nácar”) a lo largo de la cola. Las fibras colágenas obtenidas fueron sometidas durante 2 hrs a luz UV de la cámara de flujo laminar y pesadas en condiciones estériles. A

continuación se suspendieron en ácido acético 0,1% (preparado con agua destilada estéril) hasta completar una concentración final p/v de 4 mg/ml. Esta mezcla fue agitada durante 48 hrs, centrifugada a 254 x g por 30 min y conservada a 4°C.

Para preparar los equivalentes dérmicos, se mezclaron 8 vol. de colágeno (4 mg/ml) con 1 vol de Hanks 10X que contenía Ca^{2+} y Mg^{2+} . Después de ajustar pH 7,4 con NaOH 1N se agregó 1 vol de SFB (Gibco) con o sin fibroblastos humanos dérmicos previamente mitomizados. Los cultivos se efectuaron en insertos Cell Culture Insert de poro de 3,0 μm (membrana PET de alta densidad, cod. 35 3092, Becton Dickinson, USA). Las placas de cultivo utilizadas correspondieron a placas Biocat-Cell EnviromentsTM (cod. 35 5467, Deep Well Plate, Becton Dickinson, USA). Todo el procedimiento se realizó en frío para evitar la agregación anticipada del colágeno. A continuación se colocó en cada inserto 2,5 ml de la solución de colágeno. Posteriormente las matrices fueron agregadas sometiéndolas al menos 1 hr a 37°C. Para evitar la contracción de las matrices se instaló en cada inserto un anillo de vidrio (20 mm de diámetro). Los cultivos se efectuaron con DMEM-F12-10% SFB, antibióticos, funguicida y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ácido L-ascorbico a 37°C en atmósfera de 5% CO_2 . A las 24 hrs se añadieron sobre las matrices queratinocitos humanos o células HaCaT ($1,0 \times 10^6$ células/inserto). Cuando se emplearon queratinocitos humanos los cultivos se efectuaron en presencia de factores de crecimiento (ver 3.1) y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-ácido ascórbico. Los cultivos de células HaCaT se realizaron sólo con medio DMEM-F12-10% SFB, biocidas y ácido ascórbico. Después de 24 hrs adicionales, se retiró el medio contenido en los insertos y los anillos; el medio externo (de la placa de cultivo) se ajustó a 10,5 ml, de forma tal de obtener el crecimiento de los cultivos en una interfase aire-líquido. Se

efectuaron cultivos sin fibroblastos o con cantidades progresivas de éstos, por diferentes periodos de tiempo. El medio de cultivo fue cambiando cada 2 días. En la Fig 1 de los Resultados se esquematiza el procedimiento de cultivo organotípico empleado.

3.4 Histología e inmunohistoquímica

Los cultivos organotípicos fueron incluidos en medio Cryomatrix (Thermo Shandon, USA), congelados en la fase gaseosa de nitrógeno líquido y conservados hasta su uso a -80°C . De cada experimento se efectuaron cortes de $7\ \mu\text{m}$ en criostato refrigerado (Cryo-Star HM500, MICROM International G.m.b.H.) Estos fueron utilizados sin fijar para inmunohistoquímica, fijados en acetona y teñidos con hematoxilina-eosina para estudio morfológico y la técnica del ácido periódico-schiff (PAS)

Para inmunohistoquímica se emplearon los anticuerpos monoclonales anti-integrina $\beta 1$ (CD29; cod.170999, Serotec, USA); e-caderina (cod.1763, Immunotech, Marseille, Francia); (pro)filagrina (cod.BT-576, Biomedical Technologies Inc, Stoughton MA, USA); CD40 (M89) (cod.1374, Immunotech); fibronectina (cod.S-6140, Sigma). También se usaron los anticuerpos policlonales Ki-67 (cod.A0047, DAKO Co, CA, USA); y p-50 (H-119, cod.7178), c-jun (H-79, cod.1694), Egr-1 (588, cod.110), todos ellos Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA) (Tabla I). De acuerdo al método de la biotina-streptavidina-peroxidasa, los preparados fueron consecutivamente incubados con primer anticuerpo, segundo anticuerpo conjugado con biotina (DAKO LSAB[®]+ System, HRP, DAKO, USA), complejo streptavidina-biotina-peroxidasa (DAKO LSAB[®]+ System, HRP) y revelados

con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y peroxidasa (AEC Substrate System, DAKO). Los controles se efectuaron con IgG₁ de igual isotipo pero de especificidad no relacionada (DAKO). Los preparados fueron montados en medio acuoso Moviol (Polysciences, USA), con o sin tinción de contraste previa.

3.5 Microscopía electrónica de transmisión

Los cultivos fueron procesados de acuerdo al procedimiento previamente descrito por Shoop y col, (1999). Estos fueron cortados en pequeñas piezas y fijados con glutaraldehído 2%-sacarosa 0,2 M en buffer cacodilato 0,1 M pH 7,2. Después de varios lavados con buffer cacodilato 0,1 M pH 7.2-sacarosa 0.1 M, las muestras fueron post fijadas en OsO₄ 1% - K₄(Fe (CN)₆)-buffer fosfato 0.2 M durante 2 hrs. a 4°C. Las muestras fueron posteriormente teñidas en bloque con 2% acetato de uranilo, deshidratadas e incluidas en mezcla de Epon-Araldita de acuerdo al procedimiento convencional. Los cortes ultrafinos fueron contrastados con acetato de plomo 0,3% y examinados en un microscopio electrónico Philips EM300.

3.6 Estadística

Los resultados del análisis del número de núcleos inmunorreactivos a factores de transcripción nuclear se presentan como promedio \pm una desviación estándar de al menos cinco campos diferentes (X40). Los datos fueron analizados usando un test *t* de Student no pareado, considerando significativo un valor de $p < 0,05$

**TABLA I ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES UTILIZADOS
EN ESTE ESTUDIO**

Especificidad	Anticuerpo	Origen	Dilución
β 1 integrina (CD29)	3S3	Serotec	1/200
e-cadherina	67A4	Immunotech	1/100
(pro)filagrina	AKH1	Biomedical Technologies Inc.	1/200
CD40	mMb89	Immunotech	1/20
Ki-67	PoAb ¹	DAKO	1/50
c-Jun	PoAb	Santa Cruz, Biotechnology Inc.	1/50
NF κ B/p50	PoAb	Santa Cruz, Biotechnology Inc.	1/25
Egr-1	PoAb	Santa Cruz, Biotechnology Inc.	1/50
Fibronectina	FN-3E2	Sigma	1/50
IgG ₁ control ²	DAK-GO1	DAKO	1/50

¹Anticuerpo policlonal

²IgG₁ de ratón anti-glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*

4. RESULTADOS

El empleo del modelo de cocultivo organotípico de piel desarrollado por N. E. Fusenig y descrito en detalle por Maas-Szabowski y col (2004) permitió obtener un tejido de elevada semejanza morfológica a la piel *in situ* (Fig. 1). Debido a que en periodos mayores a 3 semanas los cultivos presentaron signos de degeneración, éstos se efectuaron sólo hasta por 21 días.

4.1 Los fibroblastos regulan la formación de la epidermis en cocultivos organotípicos de piel

Los cortes de crióstato teñidos con hematoxilina-eosina de cocultivos efectuados en ausencia de fibroblastos y cosechados al día 21 revelaron la producción de un epitelio atrófico con evidentes defectos de adhesión a la matriz de colágeno (Fig. 2). En cambio, cuando se emplearon fibroblastos, las células del estrato basal adquirieron forma piramidal (ver mas adelante), la estratificación del epitelio incrementó de 2 (sin fibroblastos) a 8-10 estratos (especialmente con 2×10^5 o 5×10^5 fibroblastos/ml), formándose el estrato granuloso y un estrato córneo de características ortoqueratóticas (Fig. 2). Adicionalmente, fue evidente la formación de crestas epiteliales cuando se emplearon 2×10^5 y 5×10^5 fibroblastos/ml. Debido a que no se observaron diferencias significativas entre los epitelios producidos con 2×10^5 o 5×10^5 fibroblastos/ml, se consideró que 2×10^5 fibroblastos/ml eran suficientes para inducir la diferenciación epidérmica.

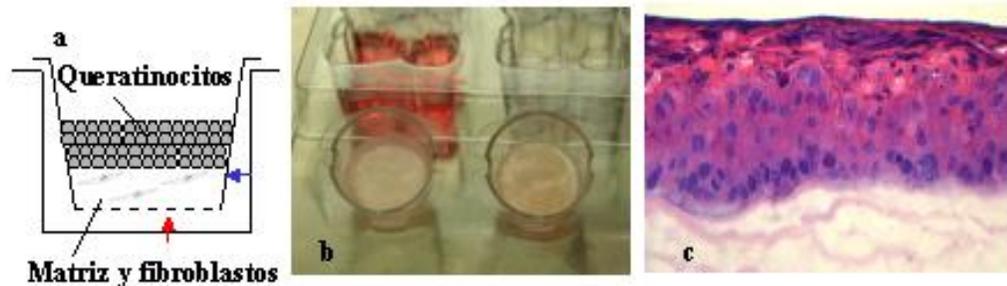


Figura 1 Cultivo tridimensional de células HaCaT sobre matrices de colágeno pobladas con fibroblastos dérmicos. a) Esquema que muestra un inserto con matriz de colágeno tipo I y fibroblastos humanos y sobre ésta, células HaCaT. La nutrición del cultivo se efectúa por difusión del medio a través de una membrana de policarbonato ubicada en la base del inserto (flecha roja). La flecha azul indica el nivel del medio de cultivo en el pocillo externo. b) Placa de cultivo e insertos con cultivos organotípicos de piel al día 21. c) Imagen histológica de equivalente dermo-epidérmico mostrado en b (2×10^5 fibroblastos/ml y 1×10^4 células HaCaT). La neo-epidermis guarda estrecha semejanza con la epidermis nativa, los fibroblastos son visibles con menor aumento en la Fig 2 (hematoxilina-eosina; X460).

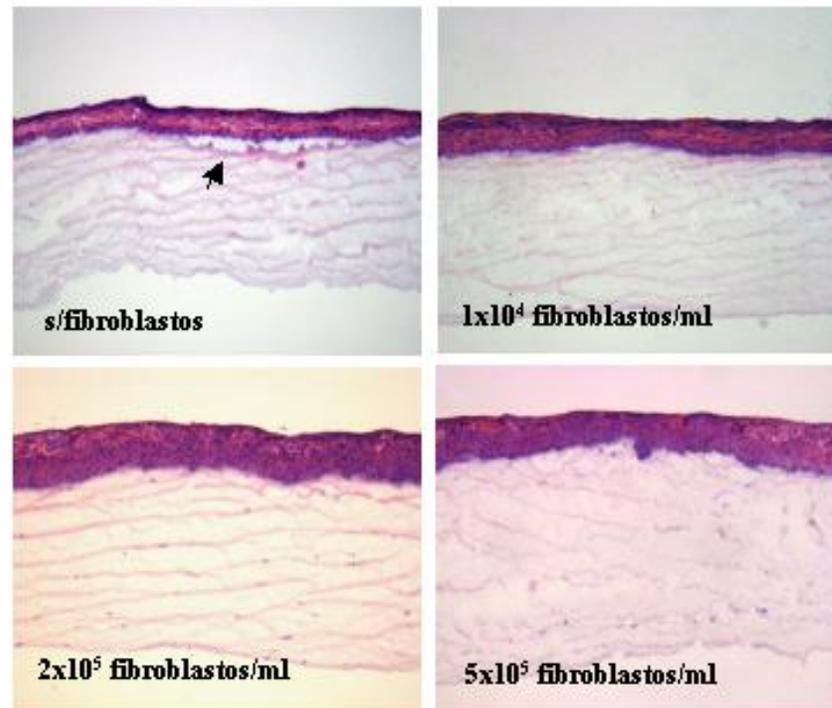


Figura 2 Efecto del número de fibroblastos sobre el crecimiento y maduración de la epidermis. Los cultivos se efectuaron sin fibroblastos o con un número creciente de éstos y con 1×10^4 células HaCaT. Observe que el espesor epidérmico, el número de estratos y la formación de crestas epiteliales aumenta progresivamente hasta alcanzar su máximo con 2×10^5 fibroblastos/ml. Es notoria la deficiencia de adhesión dermo-epidérmica producida en los cultivos realizados en ausencia de fibroblastos (*flecha*). (hematoxilina-eosina; X125)

4.2 Normalización de la expresión de los marcadores de proliferación y diferenciación epidérmica en cultivos organotípicos

El estudio de la cinética de crecimiento de la epidermis a los días 7, 14 y 21 mostró la progresiva normalización de la expresión de los marcadores de proliferación celular Ki-67; de diferenciación temprana α 1 integrina (CD29); diferenciación intermedia, e-caderina; y de la diferenciación terminal, (pro)filagrina (Fig. 3). En efecto, el análisis inmunohistoquímico de los cultivos efectuados con 2×10^5 fibroblastos y 1×10^6 células HaCaT demostró temprana marcación nuclear Ki-67+ en la neo-epidermis, la cuál en paralelo al progreso de la estratificación fue observada esencialmente solo en las células basales. Igualmente fue concordante con este patrón de normalización de la diferenciación, la identificación del marcador α 1 integrina (CD29) preferencialmente en el estrato basal de la epidermis; e-caderina, expresada tempranamente en todo el epitelio y progresivamente de localización suprabasal y por debajo del estrato córneo; y la expresión de (pro)filagrina, evidente en el estrato granuloso y córneo en etapas avanzadas de cultivo (21 días).

4.3 Influencia del número de fibroblastos en el desarrollo de la membrana basal epidérmica

La zona de unión dermo-epidérmica fue positiva al ácido periódico-Schiff y a anticuerpos anti-fibronectina en los cultivos efectuados al día 21 (Fig. 4). Ambas reacciones fueron lineales pero discontinuas y sólo se observaron con el empleo de 2×10^5 fibroblastos/ml y no en ausencia de éstos o en un número insuficiente de ellos (1×10^4 fibroblastos/ml). Aún al

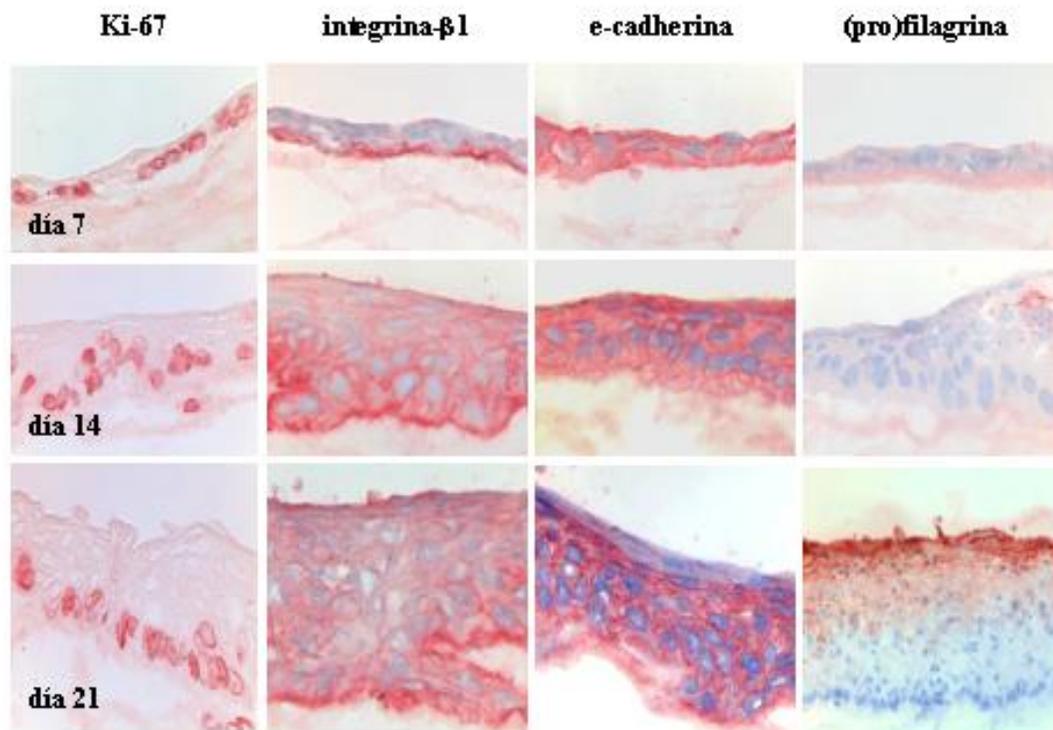


Figura 3 Normalización progresiva de la expresión de marcadores de la proliferación y diferenciación celular en cultivos organotípicos de piel (Método de la streptavidina-biotina-peroxidasa). Cultivos efectuados con 2×10^5 fibroblastos y 1×10^4 células HaCaT y cosechados a los días 7, 14 y 21. Observe la progresiva localización normalizada del marcador de la proliferación celular Ki-67; de la diferenciación temprana de los queratinocitos integrina- β 1 (CD29) y e-cadherina; y del marcador de diferenciación tardía (pro)filagrina. (tinción de contraste hematoxilina; X460)

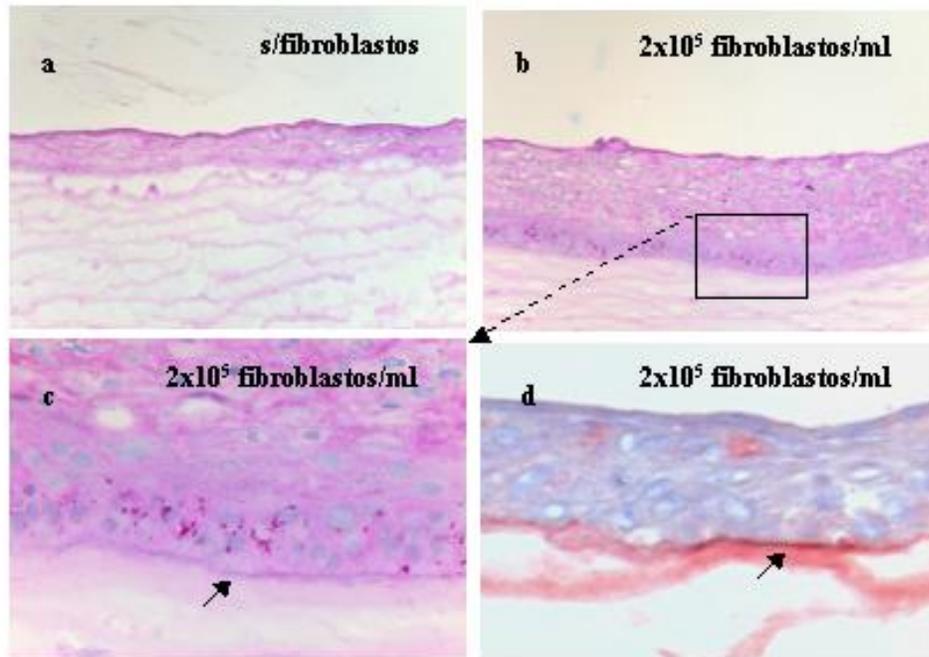


Figura 4 Efecto del número de fibroblastos sobre el desarrollo de la membrana basal en cultivos organotípicos de piel. Cultivos efectuados con un número creciente de fibroblastos y 1×10^4 células HaCaT. Los cultivos fueron cosechados al día 21. *a*, *b* y *c*) Método del ácido peryódico-Schiff. *d*) Revelado de fibronectina mediante inmunohistoquímica. Las flechas (*c* y *d*) muestran en la zona de la membrana basal acumulación de carbohidratos y fibronectina, respectivamente. (*d*, tinción de contraste hematoxilina; *a* y *b*, X 125; *c* y *d*, X460)

día 21 el estudio de microscopía electrónica de transmisión no reveló la presencia de membrana basal de características ultraestructurales netas, esto es, presencia de lámina lúcida y lámina densa (Fig. 5c). No obstante, cuando se emplearon 2×10^5 fibroblastos/ml fue posible identificar estructuras semejantes a hemidesmosomas -que incluían tonofilamentos y condensaciones correspondientes a la placa electrodensa- y fibrillas de anclaje (Fig. 5c). Ninguna de estas estructuras fue evidente en ausencia de fibroblastos o cuando se empleó un número escaso de ellos.

4.4 Los fibroblastos inducen la expresión de los factores de transcripción nuclear epidérmicos AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 en cocultivos organotípicos de piel. Probable influencia de factores solubles

En los cultivos efectuados al día 7 con 2×10^5 fibroblastos/ml y 1×10^6 células HaCaT fue evidente la temprana expresión nuclear de AP-1/c-Jun y NFκB/p50 pero no de Egr-1 (Fig. 6). La cinética de expresión de las tres moléculas reveló un progresivo aumento a los días 14 y 21, tanto de localización citoplasmática como nuclear. En paralelo con la inducción de la estratificación celular, la expresión de NFκB/p50 y de AP-1/c-Jun se localizó preferentemente en los núcleos de las células de los estratos superiores (Fig. 6 y 7). Este hecho fue especialmente evidente al día 7 y 14; sin embargo, al día 21 la expresión de ambos factores nucleares alcanzaba todos los estratos. Aunque en los cultivos de 7 días Egr-1 fue notablemente escaso, su expresión aumentó sustancialmente en los cultivos de días más avanzados sin revelar restricción por estratos como AP-1/c-Jun o NFκB/p50.

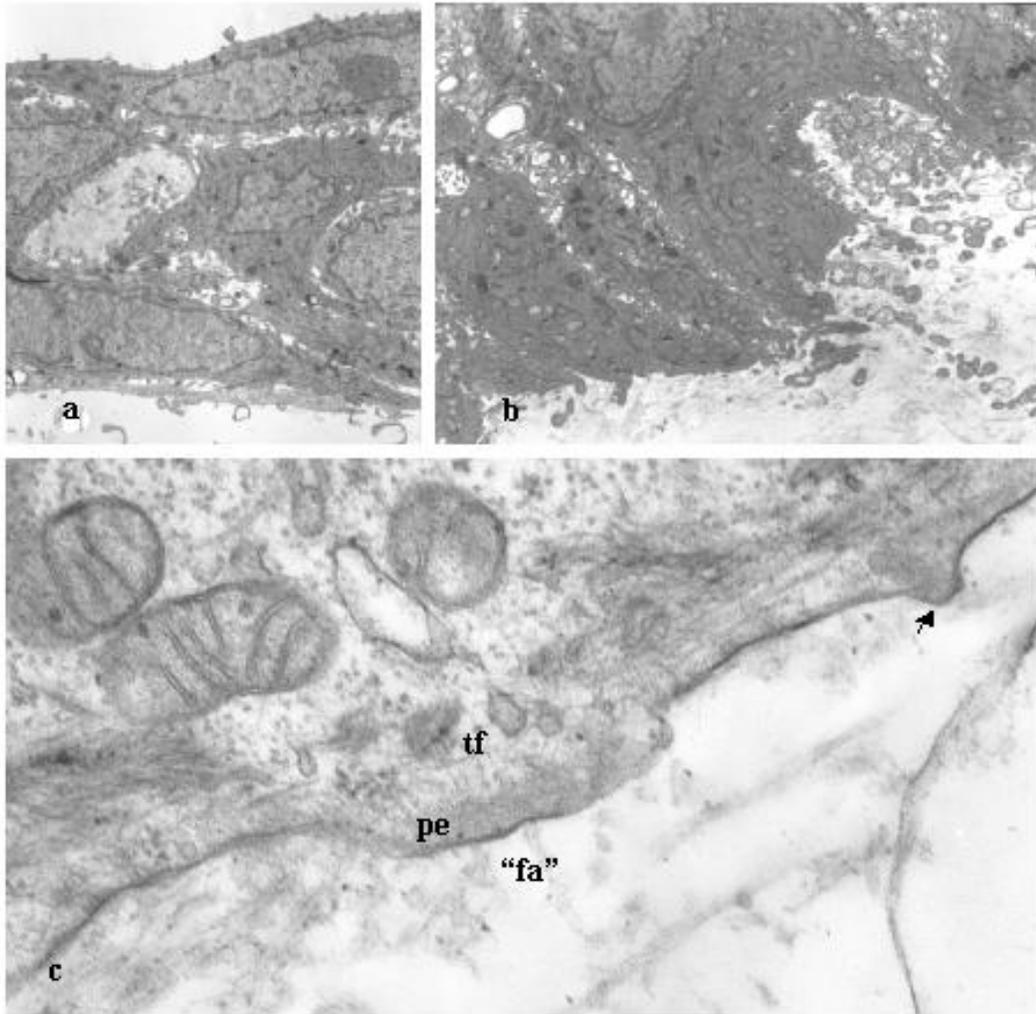


Figura 5 Ultraestructura de cultivos organotípicos de piel (Microscopía electrónica convencional, tinción en bloque con ferrocianuro de potasio-OsO₄ y acetato de uranilo-buffer maleato). Cultivos producidos con matrices de colágeno tipo I colonizadas con 2x10⁵ fibroblastos y cubiertas con células 1x10⁴ HaCaT. a) Desarrollo epidérmico al día 7 de cultivo. Las células presentan un escaso grado de diferenciación. b) Células basales de crecimiento polarizado y forma piramidal al día 14. c) Alta resolución que muestra parcial desarrollo de hemidesmosomas en células basales al día 14 (*ff*, tonofilamentos; *pe*, placa electrodensa; *fa*, estructura semejantes a fibrillas de anclaje). Se puede observar que aunque existe condensación que recuerda a la lamina densa de la membrana basal, ésta no se encuentra estructurada. No se observaron diferencias en estos resultados al día 14 o 21. (a, X5100; b, X5100; c, X60.000)

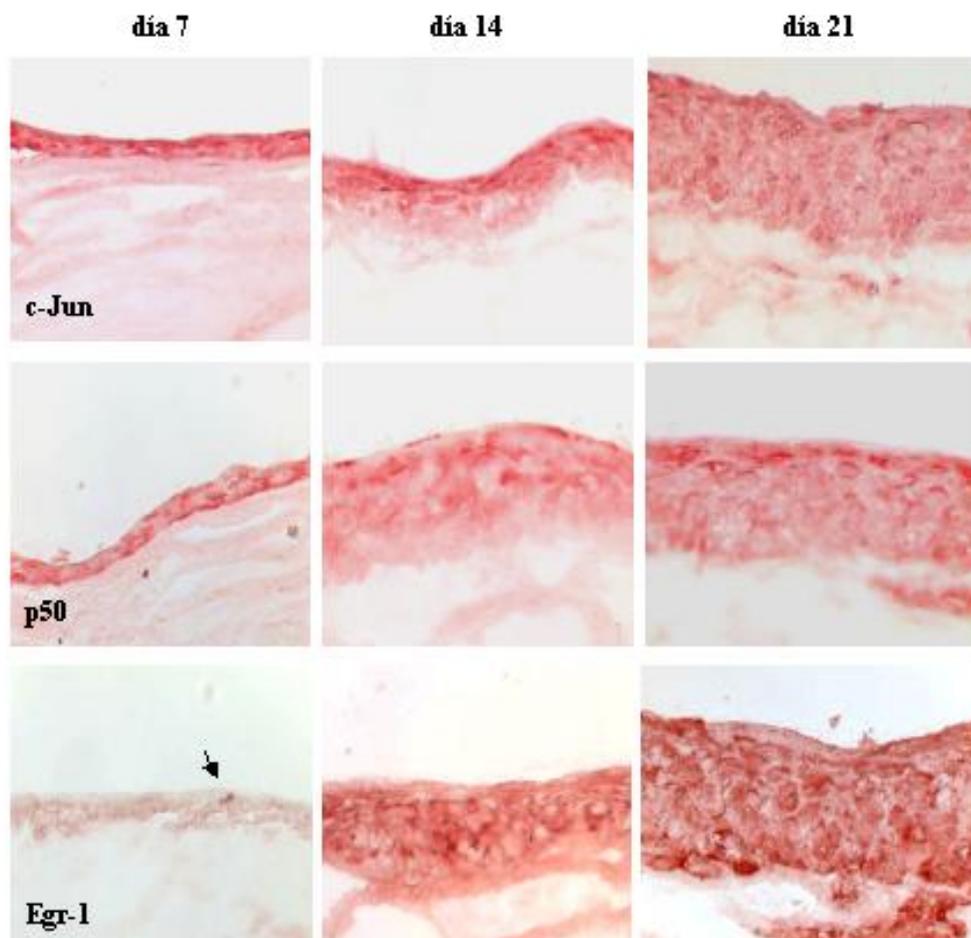


Figura 6 Expresión de AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 durante el desarrollo de la epidermis en cultivos organotípicos de piel (método de la streptavidina-biotina-peroxidasa). Cultivos efectuados con 2×10^5 fibroblastos y 1×10^4 células HaCaT y cosechados a los días indicados. A diferencia de Egr-1, durante la generación de los estratos epidérmicos la inmunorreactividad nuclear para c-Jun y p50 se localiza esencialmente en los estratos más diferenciados. (X460)

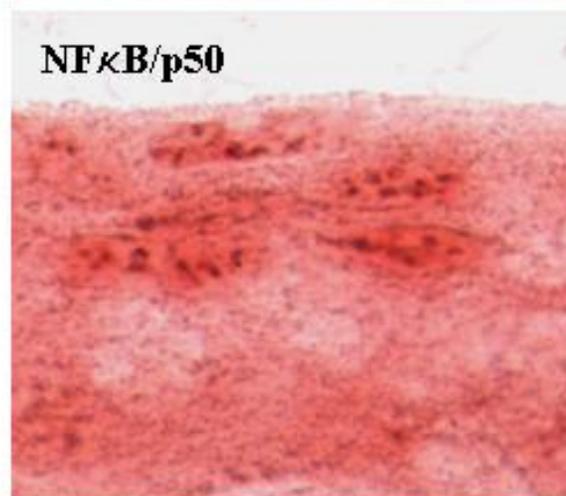


Figura 7 Demostración de la localización nuclear de la inmunoreactividad para los factores de transcripción AP-1/c-Jun y NFκB/p50 en cultivos organotípicos de células HaCaT (Método de la streptavidina-biotina-peroxidasa y AEC, sin tinción de contraste). Los cultivos fueron efectuados con 2×10^5 fibroblastos y 1×10^4 células HaCaT y cosechados al día 14. Observe que la expresión de c-Jun y p50 es preferentemente nuclear y se restringe a las células de los estratos superiores. Luego de 21 días de cultivo esta reacción se localizó en los núcleos de todos los estratos. (X1200)

En el siguiente experimento se investigó si el número de fibroblastos influía o no en la expresión de los factores de transcripción estudiados. Con este objetivo se emplearon queratinocitos humanos que fueron cultivados sólo por cuatro días en ausencia de fibroblastos o con diferentes cantidades de éstos (el cultivo de los queratinocitos por 4 días es equivalente al cultivo de las células HaCaT por 7 días). Esta estrategia permitió estudiar la respuesta celular a una etapa muy temprana de la epitelización. Como se observa en la Fig. 8, la presencia de fibroblastos además de inducir el aumento en el número de estratos, estimuló sustancialmente la expresión de los factores de transcripción AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1. En cambio, en los cultivos efectuados sin fibroblastos prácticamente no se observó expresión de estos factores. Confirmando el potente efecto de los fibroblastos sobre la expresión de AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1, un número insuficiente de fibroblastos fue incluso apropiado para inducir la expresión de estos factores.

En los cultivos organotípicos de células HaCaT (1×10^6) en que los fibroblastos fueron reemplazados por medio condicionado proveniente de la expansión de queratinocitos en presencia de fibroblastos 3T3 mitomizados (mezclado 1:4 con medio fresco; ver además Materiales y Métodos 3.1) se produjo un fuerte engrosamiento del epitelio y elevada expresión de los factores nucleares AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 (Fig. 9).

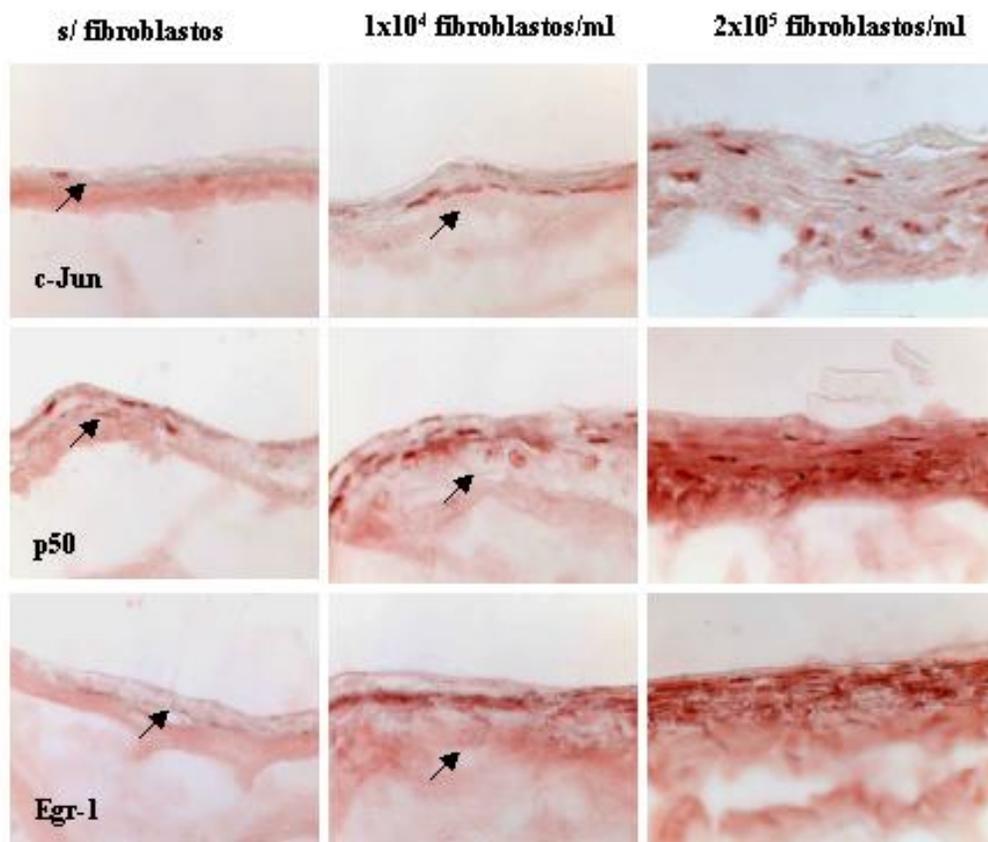


Figura 8 Efecto de los fibroblastos sobre la expresión temprana de AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 en cultivos organotípicos de piel (Método de la streptavidina-biotina-peroxidasa). Cultivos efectuados en ausencia o presencia de fibroblastos y con 1×10^4 queratinocitos. Todos los cultivos fueron cosechados al día 4. Observe que la expresión nuclear de los factores de transcripción AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 y el espesor de la epidermis producida (la cantidad de estratos) depende del número de fibroblastos. Las flechas indican la zona de unión dermo-epidérmica. (X460)

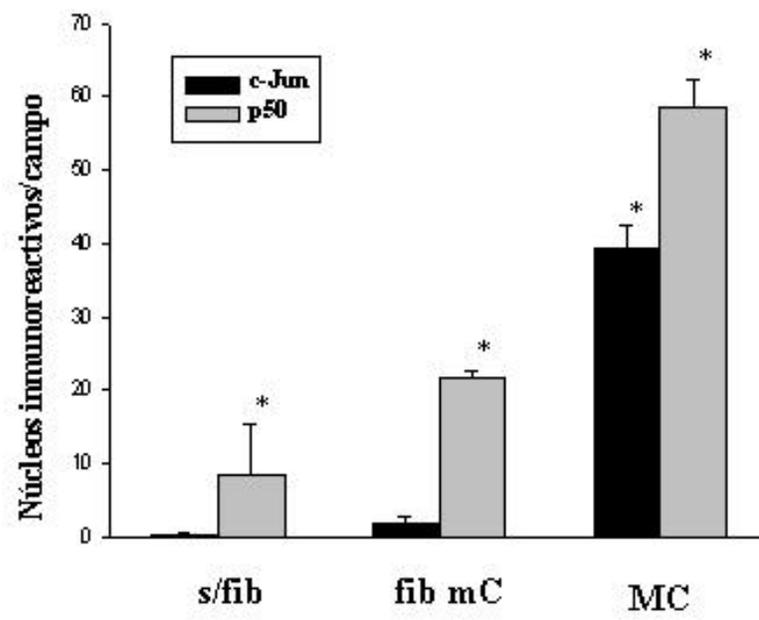


Figura 9 Inmunorreactividad nuclear temprana a los factores de transcripción AP-1/c-Jun y NFκB/p50. Cultivos organotípicos de células HaCaT (1×10^4) realizado sin fibroblastos (*s/fib*), en presencia de fibroblastos (2×10^5 /ml) mitomizados (*fib mC*), o con medio condicionado en ausencia de fibroblastos (*MC*) y cosechados al día 7. Los resultados corresponden al recuento de los núcleos inmunoreactivos a los factores de transcripción AP-1 y NFκB en al menos 5 campos ópticos (X40) de cortes de crióstato con tinción de contraste de hematoxilina. No obstante que el número de núcleos inmunoreactivos para c-Jun no fue significativamente mayor en los cultivos realizados en presencia de fibroblastos que en ausencia de estos ($p > 0.12$), la expresión de c-Jun citoplasmático fue notoriamente superior en presencia de fibroblastos. (*, $p < 0.05$)

5. DISCUSIÓN

Diversas evidencias demuestran la participación del fibroblasto en la inducción de la diferenciación epidérmica mediante un mecanismo secretorio paracrino doble dependiente de la interacción funcional entre queratinocitos y fibroblastos. Por otra parte, los resultados obtenidos por Seitz y col (1998), Takao y col (2003), Szabowski y col (2000) y Angel y col (2001) revelan que los factores de transcripción nuclear AP-1/c-Jun y NFκB/p50 participan activamente en la diferenciación de los queratinocitos. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis sugieren fuertemente que la inducción de la diferenciación epidérmica vía activación de los factores de transcripción AP-1/c-Jun y NFκB/p50 es dependiente de fibroblastos y probablemente mediada por factores secretorios producidos por éstos (Fig. 10). AP-1/c-Jun y NFκB/p50 parecen no ser los únicos factores de transcripción cuya activación es dependiente de fibroblastos, como lo sugieren los resultados obtenidos respecto a Egr-1.

El modelo de cocultivo organotípico utilizado corresponde a un método ventajoso para la producción de equivalentes dermo-epidérmicos pues recapitula de manera significativa la morfogénesis de la epidermis humana y las interacciones entre queratinocitos y fibroblastos dérmicos. En este estudio empleamos la línea de queratinocitos humanos espontáneamente inmortalizada HaCaT y en menor medida queratinocitos humanos. Los resultados con uno u otro tipo celular fueron equivalentes. Cabe hacer notar que el empleo de cultivos primarios de queratinocitos humanos, procedentes de biopsias de piel, tiene la dificultad de la alta variabilidad de las muestras humanas originada en las variaciones genéticas propias de cada donador. Para obviar este problema, resulta útil el uso de líneas celulares, las cuales

genética y metabólicamente son uniformes y además están disponibles en cantidades ilimitadas. La línea de queratinocitos humanos HaCaT, utilizada en nuestros cocultivos, aunque citogenéticamente anormales, demuestra un alto potencial de diferenciación *in vivo* e *in vitro* y ha sido extensamente utilizada como sustituto de queratinocitos humanos normales (Maas Szabowski y col, 2004).

El tejido epitelial obtenido presentó una arquitectura semejante a la epidermis *in situ* y expresó progresivamente marcadores de crecimiento y maduración característicos. En ausencia de fibroblastos el epitelio originado no sólo resultó atrófico, si no que con capacidad de proliferación y diferenciación muy limitadas. En cambio, como lo mostraron los experimentos efectuados con fibroblastos, su presencia determinó la formación de una epidermis aproximadamente madura. La formación de la membrana basal también denota la evolución y normalización de los cultivos organotípicos producidos. La membrana basal es una estructura altamente especializada, formada por condensación de la matriz extracelular y que articula el tejido epitelial con el conectivo subyacente. Consecuentemente, contribuye a las adaptaciones mecánicas de la epidermis y del conectivo subyacente a las fuerzas de tracción pero, además, modula la interacción epitelio-mesénquima mediante la expresión de una diversidad de receptores y ligandos, enzimas y sustratos, y factores de crecimiento y citoquinas (Fusenig, 1994; Clark, 2003). Esta cualidad explica la importancia de la membrana basal en la curación de la herida y en diversos procesos patológicos como la invasión de células tumorales. Los defectos en la adhesión dermo-epidérmica observados en ausencia de fibroblastos son una indicación que la formación de la membrana basal depende de la presencia de dichas células. En cambio, los cultivos realizados con fibroblastos no sólo no evidenciaron fallas en la adhesión entre ambos tejidos si no que

revelaron, además, clara acumulación de carbohidratos y fibronectina, dos componentes típicos de la membrana basal. El análisis de los cultivos con microscopía electrónica de transmisión -procesados mediante tinción en bloque para facilitar el estudio ultraestructural- reveló que en presencia de fibroblastos, pero no en ausencia de éstos, se forman estructuras semejantes a fibrillas de anclaje (que unen la membrana basal a fibras de colágeno contiguas) y hemidesmosomas que incluían tonofilamentos y condensaciones correspondientes a la placa electrodensa. Aunque la formación de una membrana basal de características estructurales típicas (presencias de laminas densa y lúcida) no se obtuvo aún en los cultivos efectuados al día 21, otros autores utilizando el mismo método de cultivo y células HaCaT han alcanzado su formación (Schoop y col, 1999). Es posible proponer que diferencias en la calidad de los componentes de los medios de cultivos utilizados influyeron en este resultado. Estimamos que el afinamiento de la técnica permitirá obtener cultivos con membrana basal de estructura madura. Smola y col (1998) revelaron brillantemente la dinámica de producción de la membrana basal y demostraron que su desarrollo de ésta depende estrictamente de la interacción fibroblasto-queratinocito. En efecto, en ausencia de fibroblastos, no se detectaron los componentes de la membrana basal laminina 1, nidogen y colágeno tipo IV, pero sí laminina 5. En cambio, en presencia de fibroblastos, dichos componentes se acumularon en la interfase dermo-epidérmica en un proceso tiempo-dependiente que requirió de tres semanas para la detección morfológica de la membrana basal. Adicionalmente, Smola y col (1998) demostraron que aunque la cinética de expresión de los mRNA de laminina 5, laminina 1, nidogen, y colágeno IV era distinta en queratinocitos y fibroblastos, la expresión de los mensajeros era regulada de manera recíproca en ambas células, indicando que la producción de la membrana basal resulta de la interacción coordinada entre ambas células.

Nuestros resultados también demuestran la participación de los fibroblastos en la expresión de los factores de transcripción AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 en los queratinocitos. La contribución de AP-1/c-Jun y NFκB/p50 a la diferenciación epidérmica fue sugerida por i) el progresivo incremento en la expresión nuclear (y citoplasmática) de AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 observado en los cultivos efectuados en presencia de fibroblastos; ii) la coincidente estratificación de la epidermis desde un epitelio de 1 o 2 capas celulares (día 7) a un epitelio netamente pluriestratificado al día 21 (con presencia de estrato granuloso y un estrato córneo ortoqueratótico); y iii) la temprana expresión de AP-1/c-Jun y NFκB/p50 en los estratos superiores. Más importante aún, la ausencia de fibroblastos bloqueó casi completamente la expresión de AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 en etapas muy tempranas de la epidermización (día 4) mientras que una cantidad insuficiente de fibroblastos (1×10^4) fue efectiva para la inducción de los factores transcripcionales y la estratificación epidérmica.

Seitz y col (1998) fueron los primeros en adjudicar una función para NFκB en la diferenciación epidérmica. Estos autores observaron que en la epidermis humana no expuesta al sol p105/p50 se expresan fuertemente en el citoplasma de células del estrato basal. En contraste, las células de los estratos suprabasales revelan expresión nuclear de NFκB y ausencia de expresión citoplasmática. Estos datos sugirieron que NFκB participa en el cambio del fenotipo proliferativo de las células basales al no proliferativo de la diferenciación terminal (propio de los estratos subbasales). La generación de ratones transgénicos que expresan IκBα resistente a la degradación produce completa ausencia de subunidades de NFκB en los núcleos de las células suprabasales (Seitz y col, 1998). Estos

animales desarrollan hiperplasia epidérmica, caracterizada por aumento del grosor de los estratos suprabasales, formación de pelo anormal y retraso del crecimiento (Seitz y col, 1998). La pérdida de la actividad de NF κ B en estos mutantes está asociada con un fuerte aumento de la síntesis de DNA en las células basales. Por el contrario, los mutantes que sobre-expresan p50 y p65 constitutivamente en el núcleo generaron epidermis hipoplásica de sólo dos capas de células viables. Los queratinocitos de dichos animales prácticamente no sintetizan DNA, como lo demuestra la ausencia de incorporación de BrdU, lo que sugiere la inhibición de la proliferación. Se ha descrito, además, que algunos inhibidores farmacológicos de NF κ B, como pirrolidinaditiocarbamato, inducen hiperplasia epidérmica en la piel normal (Seitz y col, 1998). Aunque se ha observado que en diversos desórdenes patológicos de la piel NF κ B está involucrado en la expresión de citoquinas (TNF, IL-1, IL-6), de quimioquinas (MCP-1, IL-8), de moléculas de adhesión celular (ICAM-1), de factores de crecimiento y de proteasas (Tabla II) (Bell y col, 2002), no son conocidos los genes sobre los cuales podría estar actuando NF κ B cuyos productos participan en la regulación de la diferenciación epidérmica.

De acuerdo a lo informado por Angel y col (2001), las subunidades de AP-1 expresadas en queratinocitos humanos están involucradas predominantemente en la regulación del programa de diferenciación más que en el control de la proliferación. Indicación de este efecto es la expresión restringida de c-Jun (y c-Fos) a las células en diferenciación terminal del estrato granuloso, las que son proliferativamente incompetentes. Existen evidencias adicionales de la participación de subunidades de AP-1 en la diferenciación de los queratinocitos. En efecto, son conocidas una multiplicidad de proteínas ligadas a la

TABLA II GENES EPIDÉRMICOS QUE PRESENTAN SITIOS DE UNIÓN EN SU PROMOTOR PARA LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR AP-1 Y NFκB

AP-1	NFκB
metaloproteinasas	metaloproteinasas
laminina	laminina
familia de las queratinas	queratinas
involucrina	transglutaminasa
transglutaminasa	proteínas de adhesión (ICAM-1)
loricrina	citoquinas y quimioquinas
proteína SPRR3	(facilitación de la diferenciación)
(pro)filagrina	(inhibición de la proliferación celular)

(PAHL, 1999; ANGEL Y COL, 2001; BELL Y COL, 2002)

En negrita están marcadas proteínas epidérmicas cuyos genes presentan sitios de unión para los factores NFκB y AP-1

No son conocidos los factores reguladores que facilitan la diferenciación y/o la inhibición de la proliferación celular, dependiente de NFκB.

diferenciación epidérmica cuyos genes expresan en sus promotores sitios de unión para las subunidades de AP-1. La lista de genes blancos de AP-1 (Tabla II) que codifican factores críticos de la homeostasis epidérmica incluyen transglutaminasa y diferentes miembros de la familia de citoqueratinas tales como K1, K5, K6, K8, K14, K18 y K19 (Eckert y Welter, 1996; Navarro y col, 1995; Hu y Gudas, 1994). Además, la expresión de niveles elevados de (pro)filagrina dependen del heterodímero c-Jun/c-Fos (Jang y col, 1996). AP-1 también participa asociado a otros factores nucleares de transcripción en la expresión de involucrina y loricrina (marcadores de la diferenciación intermedia y terminal, respectivamente). Por lo demás, los niveles de las subunidades AP-1 se encuentran bajo regulación del calcio extracelular que es un importante inductor de la diferenciación del queratinocitos (Angel y col, 2001).

De acuerdo a nuestros resultados la expresión de Egr-1 en queratinocitos fue dependiente de la presencia de fibroblastos. No obstante, a diferencia de AP-1 y NFκB, la expresión de Egr-1 no mostró restricción por estratos epidérmicos específicos si no que fue observada indistintamente en las diferentes capas epiteliales durante todo el lapso de cultivo estudiado. Egr-1 (Early Growth Response-1) es un gen de respuesta temprana inducido por señales ambientales que incluyen factores de proliferación y diferenciación, metabolitos citotóxicos, hormonas y neurotransmisores. *In vitro* el gen de Egr-1 responde a una variedad de señales extracelulares que incluyen el shock al calor, factores del crecimiento, angiotensina II, hipoxia, estrés provocado por estiramiento, etc. *In vivo* se ha observado su sobre-expresión como respuesta a la hepatoectomía parcial (Tsai y col, 2000). La síntesis de Egr-1 es fuertemente estimulada por las proteínas quinasas activadas por mitógenos

(ERK) (Kaufmann y col, 2002). Thiel y Cibelli, (2002), basados en que los genes que codifican los factores crecimientos insulina-II, plaquetas (PDGF) y fibroblastos (FGF) son blancos de Egr-1, han propuesto que éste podría sostener la estimulación continua de la mitogénesis vía la producción de factores de crecimiento. La activación de Egr-1 provocada por los niveles aumentados del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y FGF (a y b), colaboraría a la regeneración hepática luego de la hepatoectomía parcial (Tsai y col, 2001). Los cultivos organotípicos que hemos empleado corresponden a un modelo de epidermización en el cuál anteriormente fue identificado una importante participación de factores de crecimiento y citoquinas. Tanto el propio estímulo regenerativo como los factores paracrinos liberados por queratinocitos y fibroblastos en este modelo podrían explicar la síntesis y translocación de Egr-1 y probablemente su contribución a la epidermización.

La participación de los fibroblastos en la inducción de la expresión de los factores nucleares AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 tiene una implicancia adicional. Nosotros estimamos que productos secretorios del fibroblasto son responsables de la inducción de dichos factores de transcripción en los queratinocitos (Fig. 10). Esta idea es apoyada por la notoria epidermización y expresión nuclear aumentada de los factores de transcripción que se produjo en los cultivos tratados con medio condicionado en ausencia de fibroblastos (Fig. 9). Por lo demás en nuestros cultivos los fibroblastos se encuentran físicamente separados del epitelio. No obstante, esta idea debe ser confirmada utilizando medio de cultivo sin ningún tipo de factor de crecimiento. En sistemas de cocultivo simple, desarrollados para expandir queratinocitos con fibroblastos irradiados, se ha demostrado mediante ELISA que

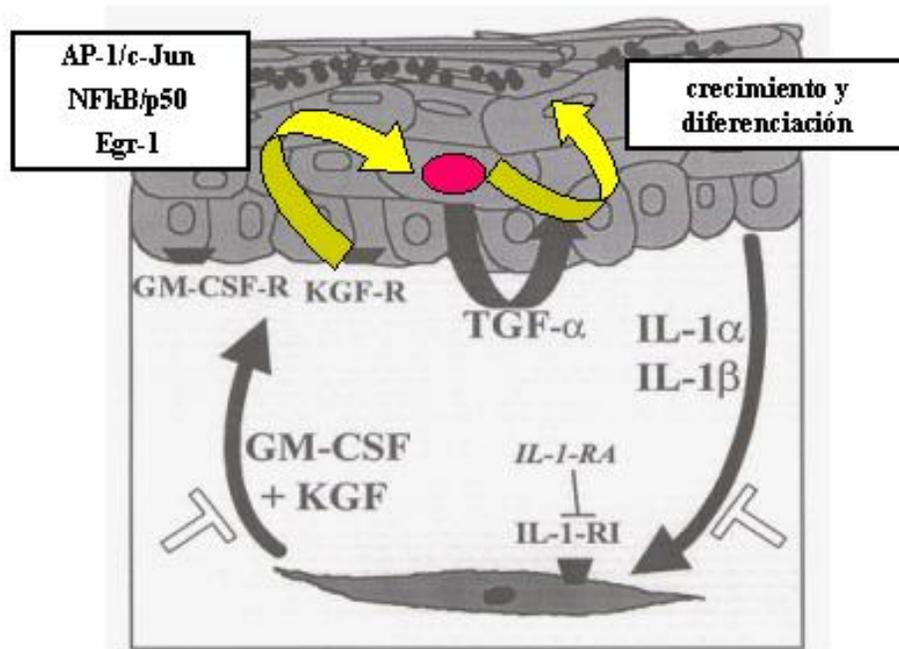


Figura 10. Importancia de los factores de transcripción AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 en el crecimiento y maduración epidérmica dependiente de la interacción fibroblasto-queratinocito. El esquema muestra la regulación del crecimiento de los queratinocitos dependiente de fibroblastos mediante un mecanismo paracrino doble que involucra IL-1 y KGF/GM-CSF según el modelo propuesto por Stark y col (2001). Los queratinocitos inician la producción de IL-1 mediante secreción autocrina de TGF-α. IL-1 actúa sobre los fibroblastos induciendo la secreción de GM-CSF y KGF. Según el modelo propuesto, estos últimos factores se unen a receptores específicos expresados en los queratinocitos, induciendo el crecimiento y maduración epidérmica. De acuerdo a nuestros resultados, proponemos que la activación de los receptores para GM-CSF y KGF induce la producción y translocación nuclear de los factores de transcripción AP-1/c-Jun, NFκB/p50 y Egr-1 los cuales se unen a sitios promotores de genes involucrados en la proliferación y diferenciación queratinocitaria. (IL-1-RA, antagonista del receptor de IL-1; ⊥ anticuerpos específicos).

los fibroblastos producen y secretan KGF, IL-6 y GM-CSF (Smola y col, 1998). En experimentos subsecuentes se observó que la adición exógena de IL-1 inducía en los fibroblastos irradiados la expresión del receptor para IL-1 (Limat y col, 1989). Mas importante, IL-1 (α y β) corresponde al principal inductor de KGF en los fibroblastos que subsecuentemente estimula y mantiene la proliferación de los queratinocitos (Maas-Szabowski y col, 1999). Este mecanismo puede ser confirmado mediante el bloqueo de IL-1 con anticuerpos o su inhibidor específico IL-1-RA. Ambos inhiben la liberación de KGF y la proliferación de los queratinocitos. Este doble sistema paracrino es también operativo en los cultivos organotípicos de piel y puede ser confirmado con inhibidores específicos (Stark y col, 2001; Fig. 10). Debido a que los cultivos organotípicos representan una condición más fisiológica, ellos permitieron demostrar que la interacción paracrina también impacta la morfogénesis epidérmica –un parámetro biológico solamente accesible en cocultivos tridimensionales- provocando la estratificación y queratinización del tejido (Stark y col, 2001). La unión de KGF y GM-CSF a sus respectivos receptores en los queratinocitos podría explicar la translocación nuclear de AP-1/c-Jun, NF κ B/p50 y Egr-1 y la inducción de la estratificación epidérmica observada en nuestros experimentos (Fig 10).

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran que los cultivos organotípicos de piel constituyen un modelo avanzado para el estudio *in vitro* de la biología de la piel. El tejido que se obtiene refleja las propiedades mitóticas, de síntesis de moléculas específicas y de diferenciación de la epidermis *in situ*. Su empleo nos ha permitido aportar nuevos antecedentes acerca de los mecanismos implicados en la regeneración epidérmica y de los procesos moleculares relacionados con la diferenciación y construcción de la barrera epidérmica.

6. LITERATURA CITADA

Akira S, Kishimoto T. (1997) NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. *Adv Immunol.*, 65, 1-46.

Andriani F, Margulis A, Lin N, Griffey S, Garlick JA. (2003) Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype. *J Invest Dermatol.*, 120(6), 923-931.

Angel P, Karin M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.*, 1072(2-3),129-157.

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

Asselineau DB, Bernard BA, Bailli C, Darmon YM. (1989) Retinoic acid improves epidermal morphogenesis. *Dev Biol.*, 133, 322-335.

Baeuerle PA and Baltimore D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell.*, 87(1), 13-20.

Barnes PJ, Karin M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.*, 336(15), 1066-1071.

Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. (1981) Living tissue formed in vivo and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science.*, 211, 1052-1054.

Bell S, Degitz K, Quirling M, Jilg N, Page S, Brand K. (2002) Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease. *Cell Signal.*, 5(1), 1-7.

Breitkreutz D, Stark HJ, Mirancea N, Tomakidi P, Steinbauer H, Fusenig NE. (1997) Integrin and basement membrane normalization in mouse grafts of human keratinocytes—implications for epidermal homeostasis. *Differentiation.*, 61(3), 195-209.

Clark RAF.(2003) Epithelial-mesenchymal networks in wound: a hierarchical view. *J Invest Dermatol.*, 120, ix-xi

Concha M, Vidal MA, Moreno I, Salem, Figueroa CD, Schmitt D. (2003) Evidence for modulation of human epidermal differentiation and remodelling by CD40. *Br J Dermatol.*, 148, 105-114.

Eckert RL, Welter JF. (1996) Transcription factor regulation of epidermal keratinocyte gene expression. *Mol Biol Rep.*, 23(1), 59-70. Review.

Elsdale T, Bard J. (1972) Collagen substrate for studies in cell behavior. *J Cell Biol.*, 54, 626-637.

Fusenig NE (1994) Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation *in vitro*. In Leigh I, Lane B, Watt F (eds). *The Keratinocyte Handbook*. Cambridge University Press., 71-94.

Gibbs S, Vicanova J, Bouwstra J, Valstar D, Kempenaar J, Ponc M. (1997) Culture of reconstructed epidermis maturation, prolonged lifespan and improved stratum corneum. *Arch Dermatol Res.*, 289, 585-595.

Hu L, Gudas LJ. (1994) Activation of keratin 19 gene expression by a 3' enhancer containing an AP1 site. *Biol Chem.*, 269(1), 183-191.

Jang SI, Steinert PM, Markova NG. (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

Jochum W, Passegue E and Wagner E. (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.*, 20, 2401-2412.

Kaufmann K, Thiel G. (2002) Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J Cell Biochem.*, 85(2), 381-391.

Limat A, Hunziker T, Boillat C, Bayreuther K, Noser F.(1989) Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol.*, 92(5), 758-762.

Limat A, Mauri D, Hunziker T. (1996) Successful treatment of chronic leg ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer root sheath cells. *J Invest Dermatol.*, 107(1), 128-35.

Maas-Szabowski N, Shimotoyodome A, Fusenig NE. (1999) Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci.*, 112, 1843-1853.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE. (2002) Cell interaction and epithelial differentiation. En Culture of Epithelial Cells. Eds. Freshney RI, Freshney MG. Wiley-Liss, Glasgow, Second Edition, p31-63.

Maas-Szabowski N, Starker A, Fusenig NE. (2003) Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF-alpha. *J Cell Sci.*, 116, 2937-48.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Szabowski A, Fusenig NE. (2004) Organotypic cocultures as skin equivalents: A complex and sophisticated *in vitro* system. *Biol. Proced. Online.*, 6(1), 55-60.

Mann A, Breuhahn K, Schirmacher P, Blessing M. (2001) Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J Invest Dermatol.*, 117(6), 1382-1390.

Matus C. (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.

Mercurio F, Manning AM. (2000) Multiple signails converging on NFκB. *Curr Opin Cell Bio.*, 11, 226-232.

Navarro JM, Casatorres J, Jorcano JL. (1995) Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation-associated keratin K6. *J Biol Chem.*, 270(36), 21362-21367.

Pahl HL. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.*, 18(49), 6853-6866.

Ponec M, Gibbs S, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Mommaas AM. (1997) Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res.*, 289, 317-326.

Regnier M, Darmon M. (1991) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates specifically the last steps of epidermal differentiation of cultured human keratinocytes. *Differentiation.*, 47(3), 173-188

Rhienwald JG, Green H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinising colonies from single cells. *Cell.*, 6, 331-334.

Rhienwald JG, Green H. (1977) Epidermal growth factor and multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature.*, 265, 421-424.

Rosdy M, Clauss LC. (1990) Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol.*, 95(4), 409-414.

Seitz C, Lin Q, Deng H, Khavari P. (1998) Alterations in NF κ B function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF κ B. *Cell Biology.*, 95, 2307-2312.

Shoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. (1999) Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocyte in organotypic cocultures with human dermal fibroblast. *J Invest Dermatol.*, 112, 343-353.

Smola H, Stark HJ, Thiekötter G, Mirancea N, Krieg T, Fusenig NE. (1998) Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res.*, 239, 399-410.

Stark HJ, Baur M, Breikreuta D, Mirancea. (1999) Organotypic keratinocyte cocultures in defined médium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *Invest Dermatol.*, 112, 681-691.

Stark HJ, Maas-Szabowski N, Smola H, Breikreutz D, Mirancea N, Fusenig NE. (2001) Organotypic keratinocyte-fibroblast cocultures: *in vitro* skin equivalents to study the molecular mechanisms of cutaneous regeneration. En *Cultured Human Keratinocytes and Tissue Engineered Skin Substitutes*. Eds. Horch RE, Munster AM, Bruce M. Achauer. Thieme Verlag, Stuttgart, p163-172.

Takao J, Yudate T, Das A, Shikano S, Bonkobara M, Ariizumi K y Cruz JR. (2003) Expression of NF κ B in epidermis and the relationship between NF κ B activation and inhibition of keratinocyte growth. *British Journal of Dermatology.*, 148, 680-688.

Thiel G, Cibelli G. (2002) Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J. Cell. Physiol.*, 193, 287-297.

Tsai JC, Liu L, Zhang J, Spokes KC, Topper JN, Aird WC. (2001) Epidermal growth factor induces Egr-1 promoter activity in hepatocytes in vitro and in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 281(5), G1271-G1278.

Tsai JC, Liu L, Guan J, Aird WC. (2000) The Egr-1 gene is induced by epidermal growth factor in ECV304 cells and primary endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 279(5), C1414-C1424.