

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Facultad de Ciencias  
Escuela de Bioquímica

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

## **5. DISCUSION**

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

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

**Carola Elizabeth Matus Velásquez**

**ValdiviaChile 2003**



# Contenido

Dedicatoria .

Agradecimientos .

1. RESUMEN .

2. INTRODUCCION .

3. MATERIALES Y METODOS .

4. RESULTADOS . .

5. DISCUSION . 1

    5.1 El fragmento BK1-5 induce la fosforilación de MAPK . . 1

    5.2 Las MAPK fosforiladas por estimulación con BK1-5 son translocadas al núcleo  
    . . 3

    5.3 La actividad de BK1-5 es mediada por el receptor B<sub>1</sub> . 3

    5.4 Efectos biológicos de BK1-5 . 4

BIBLIOGRAFIA .



## 5. DISCUSION

La evidencia acumulada indica que las cininas tienen relevancia fisiológica en un sin número de procesos biológicos que incluyen, entre otros, inflamación y regulación del flujo sanguíneo local. Una de las características más relevantes de estos péptidos es su escasa vida media (15 a 20 seg), ya que una vez generadas son inactivadas rápidamente por cininasas, produciéndose una serie de péptidos de menor tamaño, hasta ahora poco estudiados. Uno de estos péptidos, BK1-5, que hasta hace poco era considerado como un fragmento inactivo, tiene una gran estabilidad en el plasma, con una vida media que va desde 86 a 101 min (Shima y col., 1992; Murphey y col., 2000). Consecuentemente, el objetivo de esta tesis fue investigar si BK1-5 era o no capaz de activar vías de señalización celular en queratinocitos en cultivo y si en esta activación participaban receptores de tipo B<sub>1</sub> o B<sub>2</sub> de cininas.

### 5.1 El fragmento BK1-5 induce la fosforilación de MAPK

MAPK participan en la regulación de la proliferación y diferenciación en varios tipos celulares, incluidas las células epidérmicas. Cuando se usó BK1-5 se logró determinar que el patrón de fosforilación de MAPK en el tiempo, era similar al que se obtenía con el agonista B<sub>1</sub>, LDBK. Ambos péptidos mostraron una fosforilación transitoria de MAPK, ya

que ésta decrecía notoriamente a los 30 min de iniciada la estimulación. Este patrón de fosforilación fue opuesto al obtenido con el agonista B<sub>2</sub>, LBK que produjo una fosforilación de MAPK sostenida en el tiempo, incluso hasta de 120 min. Estudios recientes indican que un patrón transitorio de fosforilación es producido por estímulos que inducen proliferación, en el tipo celular analizado. Por el contrario, aquellos estímulos que inducen una fosforilación sostenida de MAPK inducen en esas células, su diferenciación (Harada y col., 2001). Cuando se ha estudiado el efecto de bradicinina (agonista B<sub>2</sub>) sobre la proliferación queratinocitos en cultivo, se ha observado que este péptido, que en otros sistemas es mitogénico, es incapaz de estimular la síntesis de DNA en estas células (Johnson y col., 1992; Coutant y col., 1995; Jung y col., 1999). Hasta el momento no existen estudios que hayan abordado el efecto de agonistas B<sub>1</sub> y de BK1-5 sobre la proliferación y/o diferenciación de las células epidérmicas. Estudios realizados en nuestro laboratorio sugieren que el agonista del receptor B<sub>2</sub>, LBK induce en el queratinocito su diferenciación (Vidal y col., 2003a), efecto hasta ahora observado sólo cuando este tipo de agonistas es utilizado para estimular células nerviosas en cultivo (Kozlowski y col., 1989). Considerando estos antecedentes, el patrón de fosforilación de MAPK parece, en efecto, depender del tipo celular involucrado, por cuanto agonistas del receptor B<sub>2</sub> en células de músculo liso vascular producen una cinética de fosforilación rápida con un máximo a los 5 min, que decae a los 30 min de activación (Velarde y col., 1999).

Cuando se investigó el efecto de la dosis dependencia sobre la fosforilación de MAPK se advirtieron claras diferencias entre cada uno de los péptidos analizados. El patrón observado para BK1-5 no parece ser dependiente de la dosis utilizada, dado que se mantuvo una intensidad de fosforilación similar a partir de dosis tan bajas como 0.1 nM, existiendo sólo un leve aumento con las dosis más elevadas. Por su parte, el agonista B<sub>1</sub>, LDBK mostró un aumento gradual de la fosforilación alcanzando niveles significativos sólo cuando se utilizó el péptido a concentraciones de 100 y 1000 nM. Este patrón de fosforilación sugiere que el número de receptores que son activados por LDBK es mínimo y que su afinidad por el ligando probablemente no sea muy alta. En favor de estas ideas, está la observación que un anticuerpo dirigido contra el extremo carboxilo del receptor B<sub>1</sub> muestra de preferencia, en queratinocitos en cultivo, inmunoreactividad citoplasmática que se concentra en la región perinuclear de estas células epidérmicas (Vidal y col., 2003b). Los ensayos realizados con el agonista B<sub>2</sub>, LBK indican que los queratinocitos expresan mayoritariamente receptores B<sub>2</sub> que pueden ser activados con dosis mínimas del péptido. Si se compara la intensidad con que cada agonista es capaz de inducir la fosforilación de MAPK podemos concluir que BK1-5 fosforila estas proteínas con mayor intensidad que LDBK. Esto se pudo comprobar más claramente cuando las células fueron estimuladas con dosis muy bajas de BK1-5 (0.1 nM) que fosforilaron MAPK con una intensidad similar a la observada con LDBK pero con dosis 1000 veces mayores.

En resumen, estos resultados indican que tanto LDBK como BK1-5 inducen un grado de fosforilación que es transitorio y menor que aquel provocado por el agonista B<sub>2</sub>, LBK. Al mismo tiempo BK1-5 tiene una mayor efectividad que el agonista B<sub>1</sub>, LDBK por cuanto sólo bastan bajas concentraciones del péptido para ver el efecto sobre la fosforilación de MAPK.

## 5.2 Las MAPK fosforiladas por estimulación con BK1-5 son translocadas al núcleo

El uso de inmunofluorescencia permitió verificar que las MAPK fosforiladas, por activación de queratinocitos cultivados con BK1-5 100 nM, eran translocadas al núcleo donde permanecían hasta alrededor de los 15 a 30 min. Coincidentemente, el agonista B<sub>1</sub>, LDBK indujo una translocación que fue similar a la producida por BK1-5.

En cambio el agonista B<sub>2</sub>, LBK provocó una translocación que se mantuvo hasta los 60 min, último tiempo analizado mediante microscopía de fluorescencia. Por lo tanto, el patrón de translocación fue compatible con lo observado mediante *western blotting*, coincidiendo el aumento de proteínas fosforiladas con un aumento de la inmunoreactividad de estas proteínas en el núcleo de la célula, que cuando se utilizó LDBK y BK1-5 fue transitoria, mientras que con LBK fue sostenida en el tiempo.

Una fosforilación y retención nuclear de MAPK sostenida en el tiempo ha sido asociada a diferenciación celular, mientras que fosforilaciones transitorias de estas proteínas han sido asociadas a proliferación celular (Robinson y Cobb, 1997; Harada y col., 2001). No obstante, el rol preponderante de MAPK en queratinocitos, aún es poco claro (Mitev y Miteva, 1999), esto debido al sin número de *cross-talk* e integración de señales existentes entre los sistemas de señalización no sólo en estas células sino que en varios otros tipos celulares. Por ejemplo, Schmidt y col. (2000), demostraron que la diferenciación de queratinocitos, inducida por calcio, está asociada a una activación rápida y transitoria de la vía Raf/MEK/Erk. Estudios futuros deberían dilucidar la vía por la cual BK1-5 induce la fosforilación de MAPK y cuáles serían los factores de transcripción activados una vez que las MAPK son fosforiladas. De igual manera podría investigarse si BK1-5 y LDBK en contraste con los agonistas del receptor B<sub>2</sub>, inducen proliferación en estas células, como parecen sugerirlo los patrones de fosforilación obtenidos en esta tesis.

## 5.3 La actividad de BK1-5 es mediada por el receptor B<sub>1</sub>

El uso de antagonistas probadamente específicos para cada uno de los receptores de cininas mostró que la fosforilación de MAPK inducida por BK1-5 sería mediada mayoritariamente por el receptor B<sub>1</sub>, dado que al preincubar los queratinocitos con el antagonista del receptor B<sub>1</sub>, Des-Arg<sup>8</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK, la fosforilación de MAPK desapareció completamente. Cuando se utilizó el antagonista B<sub>2</sub>, HOE140, también se observó una disminución de la fosforilación de estas proteínas, pero que no fue idéntica en magnitud a la observada con el antagonista B<sub>1</sub>. El resultado de estos ensayos sugiere fuertemente

que BK1-5 es un agonista de tipo B<sub>1</sub>, que además actuaría a concentraciones mucho menores que las del agonista B<sub>1</sub> humano (LDBK) tradicionalmente utilizado en la mayoría de los estudios sobre este receptor (Bhoola y col., 1992; Marceau y col., 1998).

Los estudios previos que han investigado cuál sería el efecto biológico y/o el receptor de cininas activado por BK1-5 son muy escasos. En un estudio reciente se observó que BK1-5, 1 nM no desplazaba significativamente la unión de [<sup>3</sup>H] BK al receptor B<sub>2</sub> de cininas en cultivos de células de músculo liso vascular de ratas tratadas con LPS (Morinelli y col., 2001). Estos autores también mencionan que el tiempo en el cual se llevó a cabo el estudio (5 h), no es suficiente para inducir el receptor B<sub>1</sub>. Estudios similares han mostrado que el receptor B<sub>1</sub> se expresaría después de 18 a 24 h de realizado el tratamiento con LPS (Nicolau y col., 1996). Por lo tanto, los estudios previos, así como, los ensayos realizados en esta tesis afirman la idea que el efecto de BK1-5 es mediado por el receptor B<sub>1</sub> y no por el tipo B<sub>2</sub>. Asimismo, estudios realizados a fines de la década del 70 determinaron que la parte media y el extremo N-terminal de Des-[Arg<sup>9</sup>]-BK estarían involucrados en la unión del péptido al receptor B<sub>1</sub> (Drouin y col., 1979) y que además la ausencia de la Arg<sup>9</sup> del extremo C-terminal, es esencial para otorgarle a un agonista su categoría de B<sub>1</sub> y en cambio, es perjudicial para la afinidad de un agonista al receptor B<sub>2</sub> (Marceau y col., 1998). Análisis con análogos de Des-[Arg<sup>9</sup>]-BK que tenían sustituciones en posición 5 y 8 indican que la Phe<sup>8</sup> del péptido o un anillo aromático en esa posición serían importantes para su unión exitosa al receptor B<sub>1</sub> (Drouin y col., 1979). Con estos antecedentes podríamos suponer que BK1-5 al mantener un residuo de Phe<sup>5</sup> y carecer de la Arg<sup>9</sup> cumple con parte de los requisitos para activar al receptor B<sub>1</sub> y no al tipo B<sub>2</sub> (Fig. 13).

Investigaciones futuras deberían considerar el uso de células transfectadas con cada uno de estos receptores, con el fin de reafirmar, sin lugar a dudas, el tipo de receptor que media la acción de BK1-5. Del mismo modo se podrían realizar ensayos de unión con el objeto de dilucidar si el receptor B<sub>1</sub> de cininas tiene o no una mayor afinidad por BK1-5 que por Des-[Arg<sup>9</sup>]-BK o Lis-des-[Arg<sup>9</sup>]-BK, los ligandos tradicionalmente utilizados por todos los investigadores para el estudio de este receptor.

## **5.4 Efectos biológicos de BK1-5**

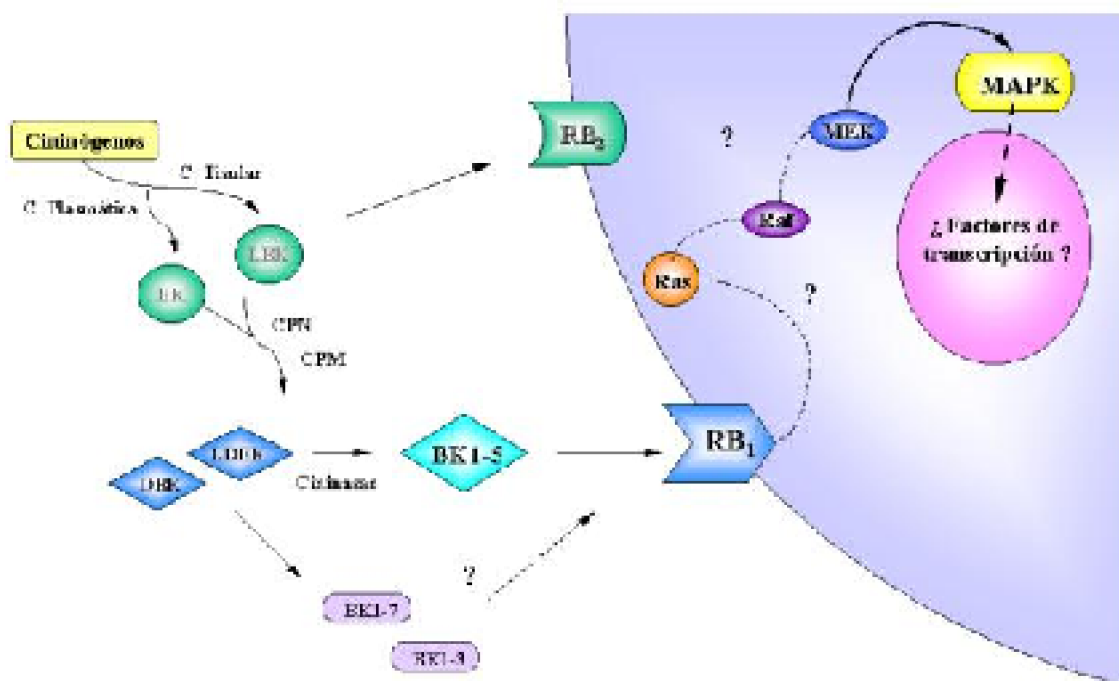
Debido a su larga vida media, varios estudios han utilizando la presencia de BK1-5 como un indicador del nivel de cininas en el plasma y de su generación en exudados inflamatorios (Murphey y col., 2001; Majima y col., 1996). No obstante de este tipo de mediciones por ELISA o radioinmunoensayo (Morinelli y col., 2002), BK1-5 ha sido considerada por décadas como un fragmento inactivo.

Sin embargo, existen algunas evidencias que sugieren lo contrario. Uno de los primeros trabajos donde se menciona que BK1-5 tendría un rol fisiológico fue el que mostró que *in vivo* BK como sus metabolitos, entre ellos BK1-5, eran capaces de inhibir la activación plaquetaria inducida por trombina (Hasan y col., 1996; Prieto y col., 2002). En trabajos posteriores, este mismo grupo estudió el rol de BK1-5 (*thrombostatin*) en



trombosis coronaria canina en donde este péptido se unía a las plaquetas y podía evitar la oclusión coronaria *in vivo* (Hasan y col., 1999); éstas e investigaciones posteriores, determinaron el mecanismo mediante el cual BK1-5 inhibía la activación plaquetaria inducida por trombina. A diferencia de lo observado en esta tesis en relación con la fosforilación de MAPK, estos autores logran inhibir el efecto de trombina sólo con altas dosis de BK1-5 (Hasan y col., 2003). Además, de estos estudios, se ha señalado que BK1-5, al igual que BK, estimularía la óxido nítrico sintetasa neural (nNOS), aumentando los niveles de óxido nítrico (Chen y Rosaza, 1996).

Estudiar el probable receptor de cininas que estaría activando este péptido de sólo 5 aminoácidos sería de gran importancia debido a la vida media y la estabilidad de este péptido en el plasma humano en comparación con los agonistas clásicos de los receptores B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, ya que se podrían estudiar procesos celulares con mayor detalle. Debido a las bajas dosis que se necesitan para activar el receptor correspondiente, en el caso que se confirme su naturaleza de agonista del receptor B<sub>1</sub>, sería de gran trascendencia para comprender las distintas patologías que afectan la piel y en especial aquellas que tienen relación con la proliferación indiscriminada de las células epidérmicas.



**FIGURA 13. BK1-5 estimula la fosforilación de MAPK mediante el receptor B<sub>1</sub> de cininas.**